



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

TÍTULO:

**“Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de
embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

Autor: MVZ. Edgar Mauricio Barba Cáceres

Director: Dr. Jorge Alberto Neira Solano. DV. MSc – PhD

Cuenca – Ecuador

2016



RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar el mejor crioprotector; para ser usado en un medio químicamente definido, sin compuestos biológicos, usando sustitutos sintéticos, capaz de mantener y/o mejorar los resultados de calidad embrionaria y sobrevivencia poscriopreservación de embriones producidos in vitro. Se utilizaron 176 embriones PIVE, provenientes de ovocitos de ovarios de matadero. Se agruparon en 2 grupos ($n=85$ y $n=91$), de 7 y 8 días, respectivamente y fueron sometidos a congelación lenta usando 6 diferentes medios que contenían dos crioprotectores: 1.5M de glicerol (GLY) y 1.5M de etilenglicol (ETY) combinados con tres compuestos: 0.4% de polivinilpirrolidone (PVP), 0.5mg/ml de ácido hialurónico (HA) y 0.4% de albumina sérica bovina (BSA). Se descongelaron y pusieron a cultivar para luego ser evaluados a las 24, 48 y 72 horas registrando las variables integridad de membrana, re-expansión y eclosión de los embriones. La integridad de la membrana plasmática fue similar entre crioprotectores suplementados con proteínas sintéticas, no obstante, la adición de BSA aumento el número de embriones de 7 días con membrana plasmática intacta en ambos crioprotectores, pero esta diferencia solo fue significativa con la combinación de etilenglicol más ácido hialurónico. La combinación de etilenglicol con ácido hialurónico o con albumina sérica bovina tuvieron porcentajes de expansión embrionaria más bajos y más altos respectivamente, y solamente entre estos tratamientos la diferencia fue significativa. Por lo tanto, el uso de proteínas sintéticas en los crioprotectores puede ser una alternativa efectiva para mantener los medios de congelación químicamente definidos y evitar los riesgos sanitarios.

Palabras claves: CRIOPROTECTOR, EMBRION, SUSTITUTO SINTÉTICO, SOBREVIDA POSCRIOPRESERVACIÓN



ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the best cryoprotectant; To be used in a chemically defined medium, without biological compounds, using synthetic substitutes, capable of maintaining and / or improving the results of embryonic quality and survival after embryo preservation produced in vitro. A total of 176 PIVE embryos were obtained from oocytes from slaughterhouse ovaries. They were grouped into 2 groups ($n = 85$ and $n = 91$), 7 and 8 days respectively, and were subjected to slow freezing using 6 different media containing two cryoprotectants: 1.5M glycerol (GLY) and 1.5M ethylene glycol (ETY) Combined with three compounds: 0.4% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.5 mg/ml hyaluronic acid (HA) and 0.4% bovine serum albumin (BSA). They were thawed and cultured and evaluated at 24, 48 and 72 hours for the variables membrane integrity, re-expansion and embryo hatching. Plasma membrane integrity was similar between cryoprotectants supplemented with synthetic proteins; however, addition of BSA increased the number of intact plasma membrane 7-day embryos in both cryoprotectants, but this difference was only significant with the combination of ethylene glycol plus hyaluronic acid. The combination of ethylene glycol with hyaluronic acid or with bovine serum albumin had lower and higher percentages of embryo expansion respectively, and only among these treatments the difference was significant. Therefore, the use of synthetic proteins in cryoprotectants may be an effective alternative to keep chemically defined freezing media and avoid sanitary risks.

Keywords: CRIOPROTECTOR, EMBRYON, SYNTHETIC SUBSTITUTES, SURVIVAL POSCRIOPRESERVACION.



CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE DERECHOS DEL AUTOR.....	9
AGRADECIMIENTO.....	10
DEDICATORIA.....	11
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
2.1. Antecedentes	15
2.2. Producción de embriones in vitro	17
2.2.1. Factores que afectan la calidad de los complejo ovocitos cumulus (COC'S)	17
2.2.2. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COC's).	17
2.2.3. Punción folicular	17
2.2.4. Clasificación de Complejo Ovocito Cúmulus (COC's)	18
2.2.5. Sistema de producción in vitro de embriones.	20
2.2.6. Medios de producción in vitro de embriones.....	32
2.2.7. Control sanitario sobre las biotecnologías de la reproducción.	41
2.2.8. Criopreservación de embriones	42
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.	49
3.1. Materiales	49
3.2. Método	50
3.2.1. Ubicación del trabajo.....	50
3.2.2. Característica de la unidad de análisis	51
3.2.3. Metodología	52
3.2.3.1. Producción in vitro de embriones.....	52
3.2.3.1.1. Colecta de ovarios en matadero y aspiración folicular	52
3.2.3.1.2. Búsqueda y maduración de ovocitos	52
3.1.1.4. Fecundación	53
3.1.1.4. Cultivo de embriones	54



3.1.2. Congelación de embriones	55
3.2. Análisis estadístico.....	58
CAPITULO IV: RESULTADOS.....	61
4.1. Integridad de la Membrana	59
4.2. Re-expansión	60
4.3. Eclosión	61
5.1. Discusión	65
6.1. Conclusiones	68
6.2. Recomendaciones.....	68
BIBLIOGRAFIA	69



LISTA DE TABLAS

TABLA 1. TIPOS DE COMPUESTOS	
CRIOPROTECTORES.....	45
TABLA 2. PESO MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES	
CRIOPROTECTORES.....	46
TABLA 3. EMBRIONES CONGELADOS EN DIA 7 DE	
DESARROLLO.....	51
TABLA 4. EMBRIONES CONGELADOS EN EL DIA 8 DE	
DESARROLLO.....	51
TABLA 5. ESQUEMA DE LA COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS	
UTILIZADOS.....	55
TABLA 6. ESQUEMA DE LAS PARTES DE UNA PAJILLA, MEDIOS Y SU	
COMPOSICIÓN.....	56
TABLA 7. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR SOBRE	
LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PORCENTAJE Y RECuento) DE	
EMBRIONES BOVINOS DE 7 DIAS, EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE LA	
DESCONGELACION.....	59
TABLA 8. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR	
SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PORCENTAJE Y	
RECuento) DE EMBRIONES BOVINOS DE 8 DÍAS, EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72	
HORAS DE LA DESCONGELACIÓN.....	60
TABLA 9. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR	
SOBRE LA RE-EXPANSIÓN (PORCENTAJE Y RECuento) DE EMBRIONES DE 7	
DÍAS, EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE LA	
DESCONGELACIÓN.....	60
.....	60
TABLA 10. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR	
SOBRE LA RE-EXPANSIÓN (PORCENTAJE Y RECuento) DE EMBRIONES BOVINOS	
DE 8 DÍAS, EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE LA	
DESCONGELACIÓN.....	61
TABLA 11. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR	
SOBRE LA ECLOSIÓN (PORCENTAJE Y RECuento) DE EMBRIONES DE 7 DÍAS,	
EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE LA	
DESCONGELACIÓN.....	62
.....	62
TABLA 12. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN EL CRIOPROTECTOR	
SOBRE LA ECLOSIÓN (PORCENTAJE Y RECuento) DE EMBRIONES BOVINOS DE 8	
DÍAS, EVALUADOS A LAS 24, 48 Y 72 HORAS DE LA	
DESCONGELACIÓN.....	63
.....	63



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. GRADIENTE DE PERCOLL	23
FIGURA 2. CURVA DE DESCENSO DE TEMPERATURAS VITRIFICACIÓN Y CONGELACIÓN LENTA	47
FIGURA 3. ESQUEMA DE LAS PARTES DE UNA PAJILLA.	56



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo, Edgar Mauricio Barba Cáceres, autor de la tesis “Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 30 de septiembre del 2016.

Edgar Mauricio Barba Cáceres

CI: 0104713011



CLÁUSULA DE DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Edgar Mauricio Barba Cáceres, autor de la tesis “Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 30 de septiembre del 2016.

Edgar Mauricio Barba Cáceres
CI: 0104713011



AGRADECIMIENTO

Sinceros agradecimientos al Dr. Alberto Neira maestro y guía, al Dr. Diego Moreno instructor y formador; al personal del Laboratorio de Patología de la Reproducción de la Escuela Veterinaria de Nantes- Francia por su apoyo incondicional y a todas las personas que colaboraron para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Del mismo modo mi eterna gratitud a quienes han apoyado esta etapa de crecimiento en mi formación profesional: esposa, amigos, familiares.

Edgar.



DEDICATORIA

A mi esposa Lily, mis hijas Mafer e Isabella; quienes con mucho sacrificio y constancia han demostrado su apoyo incondicional para alcanzar esta meta profesional.

Edgar.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA), la transferencia de embriones (TE) y la producción in vitro de embriones (PIVE) hoy en día son biotecnologías de utilización masiva en países desarrollados, en múltiples especies de mamíferos, principalmente bovinos. Para el caso del Ecuador el uso de biotecnologías de la reproducción es escasa, algunas de las ganaderías tecnificadas de la sierra están usando TE y en la costa es menor su uso; en cuanto a la PIVE igualmente es muy limitada debido a la falta de laboratorios calificados y técnicos debidamente entrenados, así mismo influyen los altos costos; mientras que en países como Brasil, Colombia y Argentina son prácticas masivas en las ganaderías tecnificadas.

El interés del uso de las biotecnologías de la reproducción se debe a la mayor posibilidad de selección y mejoramiento genético como también al interés comercial de exportación de germoplasma (semen y embriones). Sin embargo, todavía existen grandes inconvenientes técnicos que resolver entre ellos es el riesgo de transmisión de enfermedades con el uso de éstas biotecnologías, por el efecto de contagio con la manipulación de animales contaminados, y por la amplia utilización de productos biológicos en los medios de manipulación in vitro, tales como el suero fetal bovino (BSF), albúmina sérica bovina (BSA), suero fetal humano (HSF), yema de huevo entre otros; todos susceptibles de convertirse en una fuente potencial de contaminación y transmisión de organismos patógenos (Moreno *et al.*, 2004). De igual manera el uso de sueros fetales ampliamente utilizados en los medios de cultivo, implican la presencia de elementos no identificados haciendo que algunos aspectos de su función no sean aun completamente comprendidos (Mucci *et al.*, 2006; Nowshari y Brem, 2000) y que interfieran en la replicación de los resultados.

Existen varios estudios que sugieren protocolos para la producción y conservación (criopreservación) de embriones tanto in vivo como in vitro y cuyos resultados se ven afectados mayoritariamente por la utilización de productos biológicos, ya que las necesidades de los embriones varían constantemente (Côté, 2007) como también los efectos que provocan los crioprotectores en la

integridad y sobrevivencia de las células; la calidad de los embriones está bajo la influencia directa de los medios de cultivo utilizados después de la fecundación (Côté, 2007).

Se reconoce que los embriones producidos totalmente *in vitro* tienen un aspecto más opaco y presentan en el citoplasma celular microgotas lipídicas cuya cantidad dependerá de la concentración de sueros fetales o albúmina contenidas en los medios de cultivo *in vitro* (Mucci, 2003; Mucci *et al.*, 2006; Neira, 2004) estas características hacen que haya una reducción de la crio-tolerancia de ovocitos y embriones ya que puede inducir la formación de cristales de hielo y además posiblemente conduce a un trastorno en el metabolismo de su población de mitocondrias (Restrepo y Vasquez, 2009); según Côté, (2007) la adición de suero al medio de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo de embriones bovinos ya que inhibe la primera división pero estimula la formación del blastocisto dejando a entender que los medios de cultivo que actualmente se utilizan no son óptimos (Côté, 2007).

Se debe tener presente que los embriones producidos *in vitro* presentan diferencias que se traducen en un menor rendimiento de los procesos de producción *in vitro* frente a los producidos *in vivo* (Diaz, 2010); Moreno *et al*, 2004; Vireque AA, 2009); por lo que los resultados obtenidos tanto en producción como en sobrevivencia pos-criopreservación tras la inclusión de BSA a los medios son contradictorios (Thompson, 2000) y motivo de numerosos estudios (Mucci N, 2003; Neira *et al*, 2010); según Côté, (2007) el suero tiene un efecto positivo sobre la expresión génica embrionaria pero que una adición de suero al final del desarrollo es perjudicial (Côté, 2007).

La tendencia actual es la de utilizar medios definidos o semi-definidos puesto que se ha comprobado que son válidos para su uso en el desarrollo embrionario (Moreno *et al*, 2004); además no está totalmente claro cuál es el rol endocelular por el que actuarían la albúmina y el suero, por lo que algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas (Naitana *et al*, 1997; Mucci *et al*, 2006; Neira *et al*, 2010) (Moreno *et al*, 2004; Nowshari y Brem, 2000) logrando obtener medios cuya

composición sea totalmente conocida y a su vez flexible a cambios futuros en busca de mejorar los resultados (Momozawa y Fukuda, 2011). En esta investigación se pretende obtener lograr que la sobrevida pos congelación de embriones bovinos producidos in vitro y congelados en medios totalmente sintéticos es igual a la sobrevida pos congelación de los embriones producidos in vitro y congelados en medios convencionales y que incluyen productos biológicos.



CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Antecedentes

Durante muchos años, la atención de los genetistas se ha centrado en la selección de calidad y la cantidad de vacas genéticamente superiores (Hanzen, 2012) y las biotecnologías reproductivas son importantes herramientas para lograr eficiencia en la explotación pecuaria. Desde la aparición de la transferencia de embriones seguida de las biotecnologías de la reproducción, después de la Inseminación artificial, hace ya más de 30 años, millones de embriones han sido colectados y transferidos en el mundo entero.

La posibilidad congelar y conservar embriones (en nitrógeno líquido) ha sido una de las claves del desarrollo, convirtiéndose en una industria de exportación a nivel mundial. Tres factores han favorecido el comercio internacional de los embriones congelados.

- Las buenas tasas de gestación obtenidas con embriones conservados congelados, cerca del 50% según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (I.S.T.E.)
- Los bajos costos de transporte comparados a lo de los animales vivos.
- La mayor facilidad de comercio nacional e internacional de genes (semen y embriones), comparados a los animales vivos (Thibier y Nibart, 1992).

Las estadísticas más recientes muestran que el 58% de los embriones transferidos son congelados (AETE, 2009); sin embargo, aunque se han implementado diferentes protocolos para la criopreservación, aún existen varios obstáculos que resolver para mejorar las tasas de concepción utilizando embriones totalmente in vitro criopreservados, además de la seguridad sanitaria esencialmente en el contexto del comercio internacional (Díaz, 2010; Fernández, 2007; Avila *et al.*, 2006; Hanzen, 2012; Neira *et al.*, 2010).

La producción de embriones in vitro, biotecnología de la reproducción de mamíferos de tercera generación (Thibier y Nibart, 1992), después de la inseminación artificial y la transferencia de embriones, se desarrolló, a partir de ovocitos de ovarios obtenidos en matadero.

El primer ternero obtenido por fertilización *In Vitro* nació en 1981 del resultado de la transferencia de un embrión de cuatro células en el oviducto de una vaca receptora de ovocitos madurados *In Vivo* y fertilizados con semen fresco (Brackett *et al.*, 1982; Hanzen, 2012). Pero el primero nacido totalmente *In Vitro* después de una maduración, fertilización y desarrollo embrionario en 1987 (Fukuda *et al.*, 1990). Después de la obtención del primer ternero por FIV, los procesos utilizados en la maduración y fecundación *In Vitro* han sido mejorados (Brackett y Harper, 1993; Guienne, 1991; Thompson *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2002).

La producción de embriones bovinos *in vitro* se aplica en investigación y como modelo para obtener embriones en otras especies incluida la humana, además del interés zootécnico de obtener descendencia a partir de vacas de alto valor genético (Díaz, 2010; Fernández A, 2007; Palma, 2001).

El desarrollo de la producción *in vitro* de embriones permite disminuir los costos, aumentar y mejorar su eficiencia reproductiva, maximizar el uso del semen de alto valor genético, facilitar la aplicación de otras biotecnologías como transgénesis o clonaje, (Mucci N, 2003; Palma, 2001)

El número total de embriones transferidos que son producidos *in vitro*, ha crecido significativamente en los últimos años, por esta razón la importancia de los estudios que busquen hacer más eficiente dicha técnica (Oyuela L., 2010).

Los embriones para transferencia pueden ser producidos mediante técnicas *in vivo* o *in vitro*. El primer método se está desarrollando en el país dándole mayor rentabilidad a los establecimientos; mientras que la producción *in vitro* se ve restringida aun a la investigación científica.

La producción de embriones madurados fertilizados y cultivados totalmente *in vitro* (FIV) hasta su transferencia o criopreservación tiene muchas ventajas en comparación con la producción de embriones *in vivo*; ya que en esta no se trabaja con un vientre materno, evitando el contagio de enfermedades, lo cual es muy deseado por los países importadores de estos embriones. Además, se puede obtener una mayor cantidad de embriones por vaca por año. Con esta

técnica se puede mejorar la ganadería en nuestro país, debido a que se puede producir mayor cantidad de embriones a un menor costo, haciendo más accesible la técnica de transferencia de embriones a más campos ganaderos, aumentando así la productividad y la calidad de los animales.

2.2. Producción de embriones in vitro

2.2.1. Factores que afectan la calidad de los complejo ovocitos cumulus (COC's)

El ovocito es una célula de gran tamaño, con escasa irrigación directa, hecho que provoca la total dependencia de las células de la granulosa que lo rodean, para satisfacer sus requerimientos funcionales (Martinez, 2006). Su calidad tiene un rol esencial sobre el desarrollo embrionario antes y después de la activación del genoma. (Camargo y Viana, 2006).

2.2.2. Criterio de selección de los complejos cúmulus-ovocito (COC's)

Un ovocito con ooplasma homogéneo y con abundantes células del cumulus rodeándolo, es el mejor indicador de la capacidad de madurar y de desarrollar un embrión. Las células del cumulus son necesarias para el transporte de nutrientes y señales químicas dentro y fuera de los ovocitos (Martinez, 2006).

Algunos estudios han encontrado mayores tasas de desarrollo embrionario a partir de ovocitos obtenidos mediante aspiración de folículos de más de 2-3 mm de diámetro (Camargo y Viana, 2006; Neira J., 2011).

2.2.3. Punción folicular

El método permite la obtención de ovocitos mediante la punción ovárica en animales con la ayuda de un ecógrafo con sonda sectorial o convexa de 7 a 7,5MHZ como guía, adaptada a un tubo conductor protector rígido, junto con la aguja de aspiración (Nibart *et al.*, 1995); esta técnica combinada con la producción de embriones in Vitro (IVP) fue desarrollada con el fin de obtener ovocitos de hembras vivas previamente seleccionadas por su alto mérito genético (Bols, 2001); además, de permitir la disminución del intervalo

generacional (Kruip *et al.*, 1994; Hanzen, 2012); esta técnica permite obtener embriones de hembras con problemas de infertilidad o mala respuesta de los tratamientos superovulatorios (Hidalgo *et al.*, 2002).

Los resultados de embriones obtenidos a partir de aspiración folicular en vacas vivas varían de acuerdo a los diversos protocolos establecidos, es así como trabajos realizados en vacas superovuladas 3 días antes de la punción con dosis idénticas a las utilizadas en la transferencia clásica de embriones, reportan en promedio 13,9 ovocitos por vaca; en novillas cíclicas superovuladas los mismos autores reportan promedios de 9,5 y 11,6 ovocitos por colecta respectivamente promedio que disminuye en la medida en que las novillas sean más jóvenes.

En animales sin ningún tratamiento de superovulación, varios autores reportan entre 5 y 6 ovocitos por punción, realizando dos punciones por semana por animal (Nibart *et al.*, 1995; Hanzen, 2012); actualmente la OPU se muestra como una técnica poco invasiva al animal, por lo que los diferentes equipos que trabajan en el tema, apuntan en su mayoría a la no utilización de tratamientos hormonales en las donantes, permitiendo una repetitividad de la técnica en el mismo animal con una frecuencia más alta (hasta dos veces por semana durante 5 semanas), inclusive en hembras en el primer tercio de gestación (Nibart *et al.*, 1995). Estudios han demostrado que los ovocitos pueden ser colectados sucesivamente de vacas cíclicas más frecuentemente de una vez por semana (Gibbons *et al.*, 1994) pero los ovocitos colectados no tienen la misma apariencia o igual potencial para desarrollarse en embriones viables después de la maduración, fertilización y cultivo In Vitro.

2.2.4. Clasificación de Complejo Ovocito Cúmulus (COC's)

La morfología de las células del cúmulus y el aspecto microscópico del citoplasma son los aspectos considerados de mayor importancia para estimar la calidad de los ovocitos colectados, ya que se ha demostrado la relación que existe entre estos parámetros y el posterior desarrollo embrionario (Denis, 2008; Hanzen, 2012).

Otros estudios relacionan además, la talla del ovocito con el desarrollo embrionario posterior; se ha demostrado que ovocitos con un diámetro inferior a 110 micras tienen una maduración nuclear y/o citoplasmática incompleta en el momento de la fecundación y el número de blastocistos que se logra con ellos es significativamente inferior al que se alcanza con ovocitos de mayor tamaño (> 110 micras) (Denis, 2008).

Esto puede ser debido a que los ovocitos están todavía en la fase de crecimiento y son menos capaces de desarrollarse después de la fertilización. Se ha sugerido que el diámetro crítico de un ovocito para adquirir competencias de desarrollo es de 110 micras. Estos ovocitos pequeños también son propensos a sufrir alteraciones cromosómicas durante la maduración, lo que perjudica a su desarrollo posterior. (Camargo y Viana, 2006)

Se recomienda seleccionar los ovocitos con al menos una capa de células del cumulus y citoplasma homogéneo (Contreras *et al.*, 2010).

Los ovocitos destinados a MIV, morfológicamente se clasifican (Gallegos, 1998) en 3 categorías:

- **Categoría uno**, la constituyen los ovocitos que poseen un cúmulus oophorus denso, cubriendo la totalidad del diámetro del ovocito y un citoplasma finamente granular y oscuro.
- **Categoría dos**, la constituyen los ovocitos parcialmente cubiertos con células del cúmulus algo expandidas.
- **Categoría tres**, La constituyen los ovocitos que carecen de cúmulus.

Los ovocitos bovinos inmaduros se puede dividir en cuatro categorías de acuerdo con la grado de compactación de células del cúmulus y la transparencia ooplasma (Hanzen, 2012). Parece obvio que la diferencias pueden ser identificadas durante la selección y se puede atribuir a las diversas etapas de la maduración, es acompañado por cambios significativos en el área de la superficie y por lo tanto el contacto entre el propio ovocito y las células del cúmulus.

1. El COC's tiene un aspecto transparente. Cumulus (células granulares) es compacto y rodea completamente el ovocito. El ooplasma del ovocito tiene una apariencia homogénea;
2. El COC tiene el mismo aspecto igual que en la clase 1 pero el ooplasma es más irregular con un área más oscura que puede ser visible en su periferia
3. El COC todo es oscuro, es menos cúmulo compacto, el ooplasma es más irregular y estos grupos oscuros
4. El COC está totalmente expandido, cumulus ausente (ovocitos desnudos)

2.2.5. Sistema de producción in vitro de embriones.

Pese a que se pueden producir embriones in vitro de aparente buena calidad a partir de ovocitos inmaduros, la tasa de preñez de estos son un 20% menor que las de su contraparte obtenidos in vivo; además, los embriones obtenidos in vitro son más sensibles a la criopreservación (Martinez, 2006).

La obtención de ovarios provenientes de vacas sacrificadas en el matadero deben ser obtenidas dentro de 2 horas del sacrificio del animal (Hanzen, 2012) y estos ovarios suministran una fuente abundante de ovocitos obtenidos a bajo costo provenientes de animales en diferentes estados del ciclo estral, que pueden ser madurados, fertilizados y cultivados in vitro hasta estados avanzados del desarrollo embrionario (Neira J. , 2011; Moreno *et al*, 2004).

El proceso de producción in vitro de embriones bovinos puede dividirse en tres pasos fundamentales, los cuales, independientemente del protocolo utilizado, en orden cronológico son: Maduración de ovocitos, Fecundación de ovocitos maduros y Cultivo o desarrollo de embriones in vitro hasta la criopreservación o transferencia (Mucci *et al.*, 2006)

Estos tres pasos, comprenden una compleja serie de procesos fisiológicos, muchos de los cuales son aún desconocidos; condicionando cada uno por separado el éxito o el fracaso del siguiente.

2.2.5.1. Maduración in vitro (MIV)

Este proceso es la tercera fase de la ovogénesis y ocurren eventos nucleares, meióticos y citoplasmáticos. En estos últimos se incluyen los cambios en la membrana celular, y todos ellos son necesarios para que los ovocitos sean capaces de ser fertilizados y se desarrollen posteriormente (Gallegos, 1998; Côté, 2007). En esta etapa el ovocito progresa desde el estadio de diplotene hasta el de metafase II (maduración nuclear) (Neira J., 2011; Côté, 2007).

Durante la maduración y la fertilización in vitro, se han observado anomalías ultra-estructurales en los ovocitos, que podrían estar relacionadas con la baja capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto una vez fertilizados; esas anomalías incluyen la falta de dispersión de los gránulos corticales y la falta de un adecuado reordenamiento mitocondrial (Martinez, 2006). La maduración in vitro de ovocitos está sujeta a la influencia de muchos factores, la mayoría de los cuales aún no se han aclarado. En efecto, mientras que en promedio 60 a 85% de ovocitos madurados in vitro se fertilizan y se dividen sólo el 25 y el 30% llegan a la etapa de blastocisto. (Hanzen, 2012)

En relación al tamaño ovocitario, un estudio reciente, confirma que los ovocitos más grandes tienen una división meiótica normal, mientras que los más pequeños tienden a sufrir maduraciones anormales (Neira J., 2011); la capacidad de los ovocitos para lograr su maduración nuclear y citoplasma se adquiere gradualmente durante el desarrollo folicular (Hanzen, 2012).

La maduración ovocitaria debe simular las condiciones que el ovocito encontraría in vivo. Para conseguirlo se utilizan distintos medios de maduración, uno de los más habituales es el TCM-199® (SIGMA), aunque también existen otros como el medio TALP, el B2 de Menezo o el Waymounth 752/1 que es menos habitual, todos ellos medios comerciales (Neira J., 2011)

Durante la maduración in vitro, hay que procurar a los ovocitos un ambiente similar al fisiológico.

Para ello hay que tener en cuenta las siguientes condiciones: La concentración de oxígeno en el ambiente debe ser de 5% de CO₂, la humedad relativa

saturada, la osmolaridad de los medios utilizados debe estar alrededor de 290mOsm, el pH de 7.4 y la temperatura tanto a la que se procesan como a la que se cultivan de 39°C. Estas condiciones deben darse a lo largo del proceso de maduración, que suele ser de 24 horas (Neira J. , 2011). Según Côte, 2007; la maduración in vitro tiene una tasa de éxito de más 80% en vacas.

2.2.5.2. Maduración nuclear

En esta fase se da la diacinesis que implica el colapso de la vesícula germinal, la condensación de la cromatina en pares, la pérdida de nucleótidos y la membrana nuclear; todo esto se da 5 a 6 horas después de iniciado el cultivo de ovocitos y terminan la maduración 24 horas de iniciado el cultivo. (Gallegos, 1998)

2.2.5.2.1. Cambios en el cumulus oophorus

La expansión de las células circundantes del folículo preovulatorio es la principal diferencia entre un ovocito preovulatorio y uno no ovulatorio, siendo las células apretadas e invertidas características del primer estadio y las expandidas del segundo, las células compactas, inactivadas, apretadas y adheridas a la ZP responden a las gonadotrofinas y esferoides foliculares, llamándosele a este proceso activación o Mucificación. Un cumulus no expandido constituye una barrera impenetrable para los espermatozoides durante la fecundación (Berg y Reichenbach, 1992)

2.2.5.2.2. Maduración de la zona pelúcida (ZP)

La ZP es una glicoproteína secretada por el ovocito durante su crecimiento, y está compuesta por 70% de proteínas, las más conocidas son ZP1, ZP2 y ZP3, 020% de hexosa, 3% de ácido siálico y 2% de sulfato. La integridad de esta zona durante la maduración es importante porque facilita la disponibilidad de nutrientes para este proceso, aportando principalmente piruvato y oxalacetato (Gallegos, 1998; Hanzen, 2012).

2.2.5.2.3. Maduración citoplasmática

Además de la maduración nuclear, también se presenta una maduración citoplasmática, que prepara al ovocito para soportar la fertilización y el desarrollo

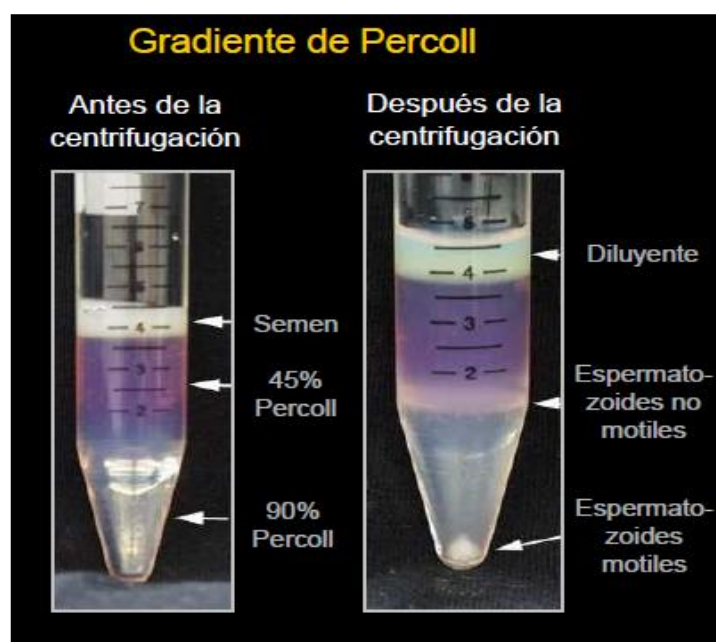
embrionario temprano. Cuando el ovocito completa todos estos cambios con éxito podemos hablar de competencia meiótica (Neira J., 2011).

La maduración citoplasmática de los ovocitos se caracteriza por la proliferación de las mitocondrias por la aparición de un aparato de Golgi bien desarrollados, y la migración de los gránulos corticales a periferia del ovocito, justo debajo de la membrana plasmática. Estos gránulos contienen un ovo-peroxidasa que durante la fertilización tiene el efecto de prevenir la penetración de espermia adicional y por lo tanto prevenir polispermia (Hanzen, 2012).

2.2.5.3. Capacitación espermática

Para conseguir la capacitación in vitro de los espermatozoides se siguen diversos procedimientos, entre los más utilizados tenemos la capacitación mediante Percoll (Figura 1) o mediante Swim-up. El primero basado en la realización de varios lavados por centrifugación, y el segundo en periodos de incubación en los cuales los espermatozoides capacitados “nadan” hacia arriba, y ésta parte será centrifugada para conseguir el pellet que se utilizará para la fecundación (Neira J. , 2011; Hanzen, 2012).

FIGURA 1. Gradiente de Percoll



Si se decide utilizar el método de la capacitación por swim- up, se debe considerar que un periodo de incubación demasiado largo podría ser menos efectivo (Neira J., 2011).

2.2.5.4. Fecundación in vitro

Para que la fertilización in vitro tenga éxito se deberán reproducir las condiciones que el espermatozoide encuentra en el tracto uterino, ya que es en ese lugar donde el espermatozoide sufre los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Martinez A., 2006).

Al igual que en la maduración de los ovocitos y en la capacitación del semen, para llevar a cabo la fecundación in vitro pueden utilizarse distintos medios, como son el TALP, el BO o el M199. Todos ellos pueden ir suplementados por distintos componentes, como células oviductales, células del cumulus, cafeína o heparina. Como ocurría en los medios de maduración y capacitación, los suplementos en los medios de fecundación también son diversos (Neira J. , 2011; Hanzen, 2012).

Una vez que el semen ha sido capacitado ya estamos en disposición de tomar la concentración adecuada del mismo para llevar a cabo la fecundación in vitro. No hay una concentración predeterminada de semen para la fecundación in vitro, aunque la calidad del mismo puede servirnos como guía y recomendar el uso de unas concentraciones más o menos altas. Los parámetros que suelen valorarse para determinar la calidad seminal serían: la presencia de espermatozoides muertos, la integridad del acrosoma y la reacción a la endósmosis (Neira J., 2011).

La concentración más frecuentemente utilizada para lograr una buena fertilización in vitro se encuentra en el rango de $0,5$ y 2×10^6 espermatozoides/ml (Neira J. , 2011). La incubación dura 18 horas a 39°C en una atmósfera que contiene 5% de CO_2 y se satura con humedad para evitar la evaporación del medio. Un aumento en el tiempo de incubación es un factor de riesgo de



polispermia. También es importante que el laboratorio se mantiene la medida de lo posible temperatura entre 25 y 30 °C. (Hanzen, 2012)

Las células restantes del cúmulus se pueden quitar mecánicamente por agitación o químicamente mediante la adición de enzimas tales como hialuronidasa o agentes químicos, tales como citrato de sodio (3% durante 5 minutos) (Hanzen, 2012)

2.2.5.5. Cultivo de embriones

Los sistemas de cultivo disponibles en la actualidad incluyen los co-cultivos, los medios condicionados y los medios sintéticos. Con respecto a los medios sintéticos, los embriones son cultivados en soluciones químicamente definidas cuyos componentes se encuentran en concentraciones comparables a los fluidos oviductal y uterino acordes al estadio de desarrollo del embrión (Martinez A. , 2006; Neira J. , 2011; Hanzen, 2012).

Los porcentajes de oxígeno en el cultivo in vitro suelen ser mayores a los que el embrión encontraría en el oviducto o en el útero, estos suelen ser de un 5% en caso de llevarse a cabo en un medio definido y de un 20% en caso de tratarse de co-cultivos (Neira J., 2011).

2.2.5.6. Desarrollo embrionario

El cigoto formado luego de la fertilización se divide en 2 blastómeras comenzando la segmentación, la cual continúa durante el tránsito del embrión dentro del oviducto y después en el útero en situaciones in vivo. En el estadio de 8 células el tamaño de los blastómeros comienza a disminuir.

El pasaje del embrión desde el oviducto al útero en condiciones in vivo, tiene lugar a los 4 días de la aparición del estro, en el estadio de 16-32 células, denominado **mórula** en compactación. Aquí las blastómeras individuales son difíciles de identificar una de otra y la masa celular ocupa la mayor parte del espacio perivitelino.

El 5º día, las blastómeras son más numerosos (más de 48 células) y forman una masa compacta, este es el estadio denominado **mórula compacta**. El embrión

ocupa el 60-70% del espacio perivitelino y su diámetro aproximado es 150 μm (Martinez, 2006).

El 6º día se diferencian dos tipos celulares: Las células de la masa celular que en un futuro desarrollarán el feto y las células del trofoblasto que rodean la incipiente cavidad en formación: el blastocelo. El embrión se convierte en **blastocisto temprano** y posee alrededor de 100 células.

El tamaño del blastocelo comienza a aumentar, lo cual es acompañado por el adelgazamiento de la zona pelúcida. Se produce la desaparición del espacio perivitelino y un aumento dramático del diámetro del embrión (1,2-1,5 x) que llega a medir 200-230 μm y posee unas 200 células, alcanzando el estadio de **blastocisto expandido** (Martinez, 2006). En promedio, el 15% (3-41% dependiendo de los autores) de ovocitos en etapa de maduración alcanzan mórula o blastocisto (Hanzen, 2012).

La re-expansión embrionaria es una indicación de la viabilidad embrionaria, ya que muestra la capacidad que tiene el embrión para poder eliminar el crioprotector, rehidratarse y recuperar su forma inicial previa a la criopreservación. En un estudio realizado en embriones de llamas, el 57.1% (4/7) de los embriones sometidos a congelación lenta presentaron re expansión (Vasquez, 2011). El conocimiento del estadio del embrión facilita su identificación.

2.2.5.6.1. Activación del genoma embrionario

La activación del genoma embrionario (EGA) es el proceso por el cual un embrión comienza a transcribir su genoma recién formado. Un embrión recién formado al inicio es transcripcionalmente inactivo, ya que está atrapado en un entorno opresivo. El ARNm y proteínas depositadas en el ovocito maduro durante la ovogénesis materna, impulsan los primeros ciclos celulares. La EGA es esencial para la síntesis de nuevas proteínas. El tiempo necesario para los embriones salgan de este entorno y comiencen la EGA varía entre las especies: fase de 4 células en los seres humanos, fase de 2 células en ratones.

Varias horas después de la fusión del espermatozoide al ovocito cesan las oscilaciones de calcio, el pronúcleo femenino comienza a formarse y la cabeza espermática se descondensa formando el pronúcleo masculino.

Después del alineamiento de los pronúcleos, las membranas nucleares se desintegran y el huso rota de manera perpendicular al eje definido por el segundo cuerpo polar, donde la posición de este último, define el plano de división o el eje polar del embrión; la cromatina se condensa en los cromosomas para dar comienzo a la primera división mitótica, produciendo un embrión de dos células. Finalmente, ocurre un proceso denominado activación génica del cigoto, que comienza con la transcripción y la traducción de proteínas codificadas por el genoma embrionario recién formado.

2.2.5.6.2. Muerte embrionaria temprana

Un fenómeno comúnmente observado durante la producción de embriones *in vitro* es el bloqueo del desarrollo temprano, el cual ocurre en una etapa concreta del clivaje para cada especie. Se han postulado diferentes hipótesis que explican este fenómeno, las cuales involucran desordenes en la cromatina, reorganización del citoesqueleto, estrés oxidativo y daños mitocondriales. Ya se ha demostrado que la cadena respiratoria de la membrana interna mitocondrial produce peróxido de hidrogeno (H_2O_2), molécula capaz de desencadenar la muerte celular; aunque el H_2O_2 ha sido asociado con el detenimiento del desarrollo embrionario temprano, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales ocurre el detenimiento se desconocen. Se sabe que la mitocondria está jugando un papel importante como productora o blanco del H_2O_2 y como mediadora de la muerte por apoptosis. La apoptosis es un mecanismo importante para el mantenimiento de un número adecuado de células funcionales y sanas; sin embargo, existen umbrales mínimos y máximos para la presentación de apoptosis asegurando la homeostasis. Si el índice apoptótico es elevado la presencia masiva de células muertas podría dañar la homeostasis del embrión y consecuentemente detener su desarrollo y morir. Se sabe que los embriones no competentes no culminan el clivaje exitosamente y se bloquea su desarrollo antes de alcanzar el estadio de blastocisto, mientras que los competentes

regulan la presentación de apoptosis y alcanzan los estadios preimplantatorios (Tarazona *et al.*, 2010).

2.2.5.6.3. Bloqueo del desarrollo embrionario temprano

Se calcula que en promedio los laboratorios pierden entre el 60 y el 70% de los ovocitos madurados *in vitro*, debido a que posterior a la fertilización el cigoto es incapaz de sobrellevar el clivaje exitosamente y se bloquea antes de alcanzar el estadio de blastocisto. El detenimiento en el desarrollo que comúnmente sufren los embriones producidos *in vitro* ocurre en un estadio específico según la especie (quinto ciclo celular en conejo, cuarto en gatos, tercero en humanos, segundo en ratón); para el caso de los bovinos el detenimiento ocurre durante el cuarto ciclo celular (Memili y First, 2000), es decir, en el paso del embrión de 8 a 16 células, momento que coincide además con la activación completa del genoma embrionario (Tarazona *et al.*, 2010).

Se plantea que el bloqueo de los embriones es consecuencia de la incapacidad para activar genes importantes para el desarrollo (p53, p21, Bax, Bcl-2) y del estrés producido por el ambiente alterado al cual están sometidos (temperatura, humedad, pH, gases, etc.) Por otra parte, Meirelles, (2004) sugieren que el bloqueo no es un fenómeno pasivo, sino que requiere la participación activa de rutas de señalización que demandan la activación del genoma embrionario. Aparentemente altos niveles de actividad mitocondrial son necesarios para los eventos celulares involucrados en la maduración, los cuales son dependientes de generación de ATP, tal como la maduración nuclear y la competencia meiótica, maduración del citoplasma, re-arreglo del citoesqueleto y la acumulación de ARNms necesarios para el desarrollo temprano antes de la activación completa del genoma embrionario (Trounson *et al.*, 2001). Posterior a la eclosión la distribución de las mitocondrias en las blastómeras del trofoectodermo cambia de perinuclear a pericitoplasmico, mientras que en las células de la masa interna la distribución se mantiene sin cambio (Tarazona *et al.*, 2006). Además (Lane y Gardner, 1998) sugirieron que los embriones tempranos dependen del ATP producido por la mitocondria vía lactato piruvato, pero que esta actividad disminuye después de la activación del genoma

embrionario; otros estudios sugieren que durante los estadios iniciales de desarrollo la competencia de los embriones depende de la producción mitocondrial de ATP como fue descrito por Lane y Gardner (1998), ya que los embriones no competentes tienen baja actividad mitocondrial y su clivaje es bloqueado antes de la activación del genoma. Esto evidencia un importante papel de la energía producida por la mitocondria en el proceso de activación del genoma (Tarazona *et al.*, 2010).

2.2.5.7. Evaluación morfológica de los embriones

Tanto los embriones producidos totalmente *in vitro* como los *in vivo* (producidos después de un tratamiento hormonal y colectados 7 días después de fecundados) tienen la misma dinámica de desarrollo, y los parámetros de clasificación se pueden aplicar de igual forma en cualquiera de los dos procesos (Oyuela L., 2010).

El sistema de clasificación de embriones más utilizado en la actualidad es el que desarrollaron Lindner y Wright, (1983) para embriones bovinos sobre la base de la morfología (Martinez, 2006).

2.2.5.7.1. Criterios

La evaluación morfológica de un embrión considera los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad:

- Forma esferoide
- Simetría de los blastómeros
- Apariencia clara y neta de los blastómeros.
- Tonalidad oscura y uniforme
- Uniformidad de la membrana celular
- Proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino.
- Integridad de la zona pelúcida
- Ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino.

- Ausencia de detritus celulares adheridos a la zona pelúcida.
- Compactación de los blastómeros entre si

2.2.5.7.2. Grados de calidad

Existen múltiples factores que pueden afectar la calidad embrionaria en la producción in vitro:

- La obtención de ovocitos con bomba de vacío puede afectar la cantidad y también la calidad; el exceso de presión puede despojar parcialmente al ovocito de las células circundantes y provocar daños en la membrana vitelina (Gallegos, 1998).
- Variaciones de la temperatura a la cual se deben transportar los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio pueden provocar aglutinación de los ovocitos (Neira J., 2011).
- El tiempo de punción folicular y de recolección de los ovocitos, influye igualmente en la competencia de desarrollo. Los ovocitos pueden permanecer en solución salina a temperatura de 30° - 37° C durante 8 horas sin llegar a afectar su calidad para los procesos de maduración y fertilización in vitro (Neira J., 2011).

La determinación del grado de calidad del embrión permite caracterizar en términos (más o menos) cuantitativos las posibilidades de desarrollo y posterior nacimiento de un ternero a partir del embrión obtenido.

Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología con ayuda de una lupa estereoscópica (0,7-6,4x).

Existen distintas escalas de calidad embrionaria, desarrolladas por distintos equipos de trabajo. Tanto la observación, como la diferenciación entre un grado y otro son subjetivas y dependen, en gran parte, de la experiencia del operador.

La IETS ha propuesto la siguiente clasificación (AETE, 2009).

- **Calidad 1: Excelente o bueno.** La masa embrionaria es simétrica y esférica, con blastómeros individuales uniformes en tamaño color y densidad.

El desarrollo del embrión es consistente con la fase del desarrollo esperada. Presenta irregularidades relativamente menores y por lo menos el 85% del material debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria. La zona pelúcida debe ser lisa y no debe tener ninguna superficie cóncava o delgada.

- **Calidad 2: Regular.** Presenta irregularidades moderadas en la forma global de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 50% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
- **Calidad 3: Malo.** Presenta irregularidades mayores en la forma de la masa embrionaria o en el tamaño, color y densidad de las células individuales. Por lo menos el 25% del material celular debe permanecer intacto dentro de la masa embrionaria.
- **Embriones de calidad 4:** Muertos, degenerados o con retrasos en el desarrollo y óvulos no fertilizados no serán transferidos.

La calidad de los embriones ha sido evaluada por examen morfológico así como también la valoración de números de la célula totales, tasas de preñez y en pocos casos a través del análisis de su expresión del gene (Stinshoff, 2011; Oyuela L., 2010)

A través de la observación de las características del embrión se puede hacer muchas determinaciones (Barcelo, 2011):

- El número de células presentes en el embrión puede estimar su edad;
- El color muy oscuro o muy claro de los blastómeros puede indicar que ha ocurrido un proceso degenerativo
- Grandes vesículas son indicativas de degeneración;
- Los blastómeros extruidos son indicativos del mal desarrollo o degeneración;
- La proporción del espacio perivitelino ocupado por el embrión es menor en el estadio de mórula compacta.

Consideraciones en la clasificación de embriones descongelados (Barcelo, 2011):

1. El color de los embriones descongelados usualmente es más oscuro que los no congelados debido a un incremento de células muertas.
2. El embrión descongelado es usualmente más pequeño, especialmente la cavidad blastocélica.
3. Puede haber daño extensivo en la zona pelúcida como cuarteaduras, desgaste o pérdida de la zona pelúcida.
4. Se puede perder la viabilidad si una gran porción del embrión es material extruido.
5. El número de inclusiones vesiculares grandes indica la extensión del daño al esqueleto citoplasmático; ésta probablemente indica destrucción masiva de organelos.
6. El grado en el que el embrión llena la cavidad de la zona pelúcida es indicativo de calidad embrionaria. Demasiada deshidratación del embrión causa demasiado encogimiento, causando daño mecánico.
7. Si las células están todavía compactas, la calidad es mejor que si estuvieran sueltas, ya que se destruyen las uniones de célula a célula, disminuyendo la probabilidad de preñez.
8. Si la apariencia del embrión es favorable comparada con la apariencia antes del congelamiento, las oportunidades de preñez se mejoran.
9. Las cuarteaduras de la zona pelúcida no necesariamente significan que los embriones están dañados.

2.2.6. Medios de producción in vitro de embriones

Según Côté, 2007; la elección de la concentración de cada componente del medio de cultivo, tiene un impacto sobre los demás. Dos enfoques se utilizan para determinar la concentración de los componentes necesarios en los medios de cultivo:

- El principio de decir "elige el embrión "
- El principio de "retorno a la naturaleza "



El primero es un principio que nos prueba a ciegas distintas concentraciones y observar cómo el embrión responde. El segundo principio trata de imitar las concentraciones a las que está expuesto el embrión en la naturaleza (Côté, 2007). Con base en los principios antes mencionados, numerosos trabajos han sido publicados en los últimos años, buscando obtener medios totalmente definidos con resultados variables, muchos de ellos alentadores.

2.2.6.1. Parámetros biofísicos.

- **Osmolaridad.** Según los valores observados en las secreciones uterinas, podría asumirse que lo óptimo sería 280 ± 20 mOsm/Kg. Estudios realizados en ovocitos humanos concluyen que efectos hiperosmóticos a 600, 1200 y 2400 mOsm resultaron en 40, 44 y 100% de estructuras anormales, respectivamente (Mullen et al., 2004)
- **pH.** La mayoría de los embriones de mamíferos cultivados in vitro se desarrollan en pH neutro o ligeramente alcalino, encontrándose los mejores resultados entre 7,2 y 7,6.
- **CO₂ y O₂.** La fase gaseosa más utilizada es aquella compuesta por 5% CO₂ en aire para la maduración ovocitaria y fertilización, y 5% O₂, 90% N₂ y 5% CO₂ para el desarrollo embrionario.
- **El fluido oviductal bovino y ovino** se caracteriza por bajos niveles de Na y altos niveles de K, comparados con los niveles plasmáticos. Estos dos elementos son cuidadosamente balanceados al formular los medios de cultivo.
- **El agua** participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario. La mayor resistencia ofrecida es 18,3 megaohms-cm a 25°C.

2.2.6.2. Componentes de los medios

Según Côté, 2007; dos problemas surgen en el desarrollo de medios: la primera en la selección de componentes para ser incluido en el medio, y en segundo

lugar el determinar la concentración de cada uno de los componentes seleccionados.

Los componentes y concentraciones deben ser apropiadas para cada etapa sea esta maduración, fertilización o desarrollo; tener en cuenta que algunas sustancias son más difíciles para integrarse en el medio de cultivo que otras, incluyendo las vitaminas A y E, que se disuelven muy mal. La composición de un medio ideal es muy difícil de definir (Côté, 2007). He aquí una breve descripción de los principales componentes:

2.2.6.2.1. Elementos orgánicos.

Existe una gran cantidad de información referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios en la producción in vitro de embriones. Estos son:

2.2.6.2.2. Fuente de energía.

Las fuentes de energía más utilizadas en los medios de embriones son, en general, el **lactato**, el **piruvato** y la **glucosa**. Se ha demostrado que durante los primeros estadios, antes de la activación del genoma embrionario, los embriones utilizan preferentemente piruvato, lactato y glutamina como fuente de energía, aumentando considerablemente la utilización de glucosa en estadios más avanzados de desarrollo (Mucci *et al.*, 2006; Côté, 2007).

La falta de utilización de la glucosa durante los primeros estadios estaría dada por la falta de actividad de la enzima fosfofructoquinasa, la adición de glucosa a los medios de cultivos no solamente no sería aprovechada, sino que, a su vez, generaría un efecto inhibitorio sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, en embriones bovinos a partir del estadio de 8-16 células hay una alta demanda de energía necesaria para la compactación, y la formación y expansión del blastocelo.

Con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácido linoleico no como fuente energética, sino como fluidificador de las membranas plasmáticas (Mucci *et al.*, 2006).

2.2.6.2.3. Fuentes de proteína.

- **Aminoácidos.** Participantes de la regulación del desarrollo embrionario. Estos elementos serían utilizados como fuente de energía, como buffer intracelular y para la síntesis de proteínas, siendo incorporados por transportadores de membrana específicos regulados en función del estadio de desarrollo o en respuesta a señales externas.

Los aminoácidos esenciales son: Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Arg, Cys, Gln, His, Tyr y los no esenciales son: Ala, Ser, Gly, Asp, Asn, Glu, Pro (Côté, 2007). Se ha demostrado que los aminoácidos no esenciales favorecerían el desarrollo en estadios tempranos, mientras que los esenciales harían lo mismo en embriones de más de ocho células (Mucci *et al.*, 2006). Existe por lo tanto no hay ningún medio con una concentración óptima de aminoácidos.

- **Macromoléculas.** Usualmente se agrega **suero bovino y/o albúmina sérica bovina (BSA)** como fuente de proteínas a los medios de cultivo embrionario.

El suero constituye la fracción líquida resultante del proceso de coagulación sanguínea, tanto in vivo como in vitro, y su calidad, en términos de composición química, depende usualmente del tipo y estado del donante.

La albúmina es una proteína plasmática de carácter ácido, soluble en agua, con un peso molecular aproximado de 69.000, y constituye uno de los componentes más importantes del suero sanguíneo. Debido a la presencia de grupos reactivos en su molécula, puede unirse a diferentes sustancias (ácidos grasos, hormonas, etc.) y transportarlas en sangre hasta sus órganos blanco. Junto con la



inmunoglobulina G, son las proteínas más abundantes del fluido oviductal, y su pureza puede variar entre lotes (Mucci N, 2003).

Algunos de los efectos benéficos que justifican la utilización del suero y la albúmina son:

- Proteger a los embriones en cultivo de sustancias tóxicas (ej. Metales pesados).
- Aportar factores de crecimiento y ciertas hormonas.
- Reducir la tensión superficial del medio, evitando que los embriones se adhieran al instrumental (placas de cultivo, pipetas, tubos, etc.).

2.2.6.2.4. Otros componentes

La adición de **heparina** (2-5 UI / ml) ayuda a reducir la formación de coágulos en los tubos y el tubo de recogida. Sin embargo, el contacto prolongada (más de 60 minutos) de ovocitos con este medio es probable que reduzca el potencial de desarrollo. Por lo tanto se debe colocar tan pronto como sea posible en un medio no heparinizado (Hanzen, 2012; Salgado *et al*, 2005).

Se sugiere que en el cultivo *in vitro* una alta concentración de **FSH** produce una alta proporción de mórulas, la adición de FSH en el medio de maduración *in vitro* incrementa en 50% el reinicio de la meiosis de los Complejos Ovocitos Células del Cúmulo (COC's), en comparación con complejos no estimulados o con adición de hCG en bovino. La FSH estimula el proceso de maduración del ovocito de ovino (Fernandez *et al.*, 2007).

El uso de una combinación de **factores de crecimiento recombinantes y citoquinas**, como el IGF-I, IGF-II, bFGF, el TGF β 1-, LIF, y GM-CSF, produce resultados similares a 10% de suero fetal de ternero para el desarrollo de in vitro- producidos embriones de la especie bovina. Este método totalmente sintético de la cultivo de embriones tiene ventajas innegables para la bioseguridad de la transferencia de embriones (Neira *et a.l*, 2010).

La **L-Glutamina** es parte de todos los medios de cultivo definidos. Se utiliza para funciones de osmolito orgánico glucogénico aminoácido, precursor metabólico y la fuente de nitrógeno. Si se añade glutamina al medio de cultivo a una concentración demasiado elevada (2:3 mmol) provoca una inhibición del desarrollo del embrión. La concentración ideal es 1 mmol. Con tal concentración, puede ver un aumento en el número de células en la ICM y el trophoctodermo. (Côté, 2007)

2.2.6.3. Efecto de la suplementación con suero sobre la cantidad y calidad de los embriones producidos in vitro.

En el cultivo in vitro las condiciones afectan tanto la expresión maternal y embrionaria de genes y tienen probabilidad de alterar los ovocitos y su competencia para el desarrollo embrionaria (Vireque, 2009).

Uno de los problemas que presenta la utilización de los sueros fetales en los medios de cultivo de cualquier tipo celular, además de la falta de definición es la variabilidad encontrada entre diversos lotes del mismo producto que, consiguientemente, ocasiona variabilidad en los resultados obtenidos según diferentes laboratorios o experimentos dentro del mismo laboratorio (Martinez B. , 2002). Se ha observado que la adición de suero a los medios de cultivo tiene un efecto bifásico sobre el desarrollo embrionario, inhibiendo los primeros estadios y estimulando el desarrollo de mórulas y blastocistos. Según Côté, 2007; inhibe la primera división, pero estimula la formación de blastocisto, produce el bloqueo de determinadas especies y la viabilidad reducida (baja desarrollo) en los seres humanos y animales domésticos, dejando a entender que los medios de cultivo que actualmente se utilizan no son óptimas.

Al mismo tiempo, su empleo también se ha visto relacionado con una aceleración del desarrollo embrionario, asociado a un número mayor de células embrionarias y a una mejora en la tasa de producción y eclosión. El suero es considerado un compuesto variable e indefinido, lo cual genera variaciones en la

composición de los medios utilizados e interfiere con la repetitividad de los resultados obtenidos (Mucci et al., 2006).

Según Mucci et al., (2006), se han observado diferencias en cuanto a la tasa de producción entre distintos ensayos publicados en los cuales se utilizó suero como suplemento proteico, y esto podría deberse a:

- **Tipo de suero y momento de su inclusión:** el suero más utilizado es el SFB. Con respecto a las proteínas, sus concentraciones son superiores en un 85% en el caso del suero adulto respecto del fetal, y aunque poco se conoce acerca de la función de proteínas no específicas en el desarrollo embrionario, su metabolismo podría producir amoníaco que puede dar diferencias en las tasas de producción total de embriones.
- **Variaciones en la concentración de factores embriotróficos:** el factor transformante de crecimiento α (TGF) y el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1) reducen la incidencia de apoptosis y aumentan el número de células embrionarias, mientras que el factor de necrosis tumoral α (TNF) induce apoptosis y fragmentación de ácidos nucleicos. Todos estos elementos podrían explicar la falta de consistencia en los resultados de los distintos autores que utilizaron suero, el efecto embriotrófico del suero es complejo y que son necesarios más experimentos para clarificar los componentes específicos que lo producen.

Algunos efectos negativos que han sido atribuidos al uso de suero en los medios de cultivo son:

- alteraciones mitocondriales
- excesiva producción de lactato,
- presencia de células oscuras y granuladas en la masa celular interna
- aumento de células apoptóticas
- menor síntesis proteica
- disminución de la relación células de la masa celular interna: células trofoblásticas y del número de complejos de unión entre las células embrionarias

- alteraciones durante la preñez en hembras gestantes de embriones producidos con suero, tales como alargamiento del período de gestación y nacimiento de crías con peso superior a lo normal (large off spring syndrome).
- alteraciones en la expresión de genes que desempeñan un rol de particular importancia durante el desarrollo embrionario temprano (Mucci *et al.*, 2006).

2.2.6.4. Efecto del suero sobre la viabilidad de los embriones criopreservados.

- La suplementación de los medios de cultivo con suero se ha relacionado con la acumulación anormal de gotas lipídicas (Mucci *et al.*, 2006)
- Alta sensibilidad a los procesos de criopreservación, esto se debería a una mayor relación de lípidos: proteínas en el caso de los primeros (Côté, 2007).

2.2.6.5. Uso de sustitutos sintéticos del suero en los medios de producción in vitro de embriones.

Si bien no está totalmente claro cuál es el rol endocelular por el que actuarían la albúmina y el suero, algunas de sus propiedades físicas podrían ser reemplazadas mediante la utilización de sustancias definidas (Block, Bonilla, y Hansen, 2010; Moreno *et al.*, 2004; Mucci *et al.*, 2006; Vireque AA, 2009; Momozawa y Fukuda, 2011)

La tendencia actual es prescindir del uso de productos biológicos en los medios para evitar problemas sanitarios evitando riesgos sanitarios en la producción in vitro de embriones.

Las nuevas razones prácticas por las que se usan medios definidos son porque estos son reproducibles en diferentes momentos, en laboratorios diferentes, que pueden variar de una manera controlada, y son libres de



actividad biológica desconocida, tales como enzimas y factores de crecimiento que pueden afectar a las respuestas estudiadas (Côté, 2007)

Es así que algunos autores han realizado ensayos con diferentes sustitutos del suero tanto en medios de maduración, fertilización o cultivo; entre ellos:

2.2.6.5.1. Ácido hialurónico (HA)

Según Block et al, 2010; el uso de ácido hialurónico (HA) en los medios de cultivo de embriones incremento el porcentaje de blastocistos y la tasa de re-expansión a las 24 horas. Las receptoras que recibieron embriones en etapa de mórula y blastocisto tratados con ácido hialurónico presentan una tasa de preñez superior a las receptoras que recibieron los embriones control de la misma etapa.

Block et al., concluye que la adición de ácido hialurónico mejora el rendimiento del cultivo de embriones a estadio de blastocisto, mejora supervivencia después de la vitrificación, y mejora la supervivencia después de la transferencia de embriones.

Martínez et al. (1998), en un estudio concluye que con 1 mg / ml HA mejora el desarrollo de IVM / FIV de embriones de bovino a la etapa de blastocisto, sin afectar la calidad del embrión y la supervivencia posterior a la congelación.

2.2.6.5.2. Polivinilpirrolidona (PVP)

El uso de polímeros sintéticos, como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, es frecuente desde hace varios años en la producción in vitro de embriones (Naitana *et al*, 1997; Gardner y Lane, 1998; Momozawa y Fukuda, 2011).

Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a la albúmina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin estos componentes (Thompson, 2000; Orsi y Leese, 2004)

Según Mucci et al (2006), actualmente existen en el mercado compuestos formulados con el fin de remplazar el suero en los medios de cultivo de distintas líneas de células somáticas. Entre estos se encuentran el Ultrosor G[®] (Invitrogen), un sustituto del SFB, y CPSR - 3[®] (Controlled Process Serum Replacement, SIGMA), el cual se obtiene por dializado del plasma bovino (Mucci et al, 2006).

El empleo de medios de cultivo libres de suero podría ser beneficioso para mejorar la calidad de los embriones producidos in vitro, permitiendo progresar en el entendimiento de los requerimientos embrionarios durante los estadios de pre-implantación, ya que la eliminación de un compuesto altamente variable e indefinido, como lo es el suero, posibilitaría comprender la función que desempeña cada componente incluido en los medios de cultivo; además, permitiría evitar las alteraciones embrionarias (morfológicas y fisiológicas) y durante la gestación, atribuidas a la utilización de suero en los medios de cultivo (Mucci et al, 2006; Momozawa y Fukuda, 2011)

2.2.7. Control sanitario sobre las biotecnologías de la reproducción.

El último informe del IETS muestra que, en 2008, se transfirieron 800.000 embriones de bovinos en todo el mundo (un tercio de como embriones PIV) en casi todos los continentes y en todas las regiones. A pesar que han habido epidemias importantes en muchas partes del mundo ninguna de ellas se han asociado con la transferencia de embriones, indicando que no hay contaminación importante de patógenos asociado con los embriones que se haya identificado. Sin embargo, algunos patógenos parece que se adhieren más fácilmente a los embriones PIV. Tales interacciones pueden diferir de un patógeno a otro, un ejemplo de las diferencias entre IVD y Embriones PIV es en su interacción con el virus de la fiebre aftosa (Thibier, 2011).

Thibier y Guérin (1993), describen una serie de riesgos en el proceso de producir embriones PIV y en los que podrían participar los agentes infecciosos. Estos riesgos están relacionados con:

- La hembra donante y el modo de recogida (matadero colección u óvulo pick-up) el proceso de maduración
- Fertilización (la introducción de semen)
- Co-cultura en el desarrollo in vitro
- Criopreservación
- El último paso, la descongelación y la transferencia

Actualmente se están asociando los riesgos con productos de origen animal, tales como la albúmina de suero bovino. En general todos los productos de origen animal son gradualmente eliminados y reemplazados por moléculas por lo general de origen vegetal. Estas técnicas, debido a sus características y utilización, están muy cerca a las condiciones naturales de fertilización y gestación. Sus términos de implementación, marco normativo que es asociada en particular con respecto al control la salud se han centrado principalmente en la salud de los animales objetivo (Thibier y Nibart, 1992).

2.2.8. Criopreservación de embriones

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas (Avila et al, 2006).

La criopreservación de embriones presenta numerosas ventajas, desde el punto de vista biológico como comercial (Cabodevila). Entre ellas cabe destacar (Diaz, 2010):

- Permite reducir costos.
- Evita la dependencia de la actividad reproductiva cíclica y del estado fisiológico de los animales.
- Limita la deriva genética (cambios en las características de una población debido a variación en la frecuencia de los genes).
- Elimina las patologías que se asocian al mantenimiento de animales vivos.
- Hace posible la conservación de razas o especies en riesgo de extinción mediante la creación de bancos de embriones y/o gametos congelados.

En 1953 Smith, intenta congelar embriones en animales domésticos, luego del descubrimiento de la acción protectora del glicerol, demostrando que la exposición de embriones de animales domésticos a bajas temperaturas (-79°C y -196°C) no afectó el desarrollo de éstos (Roa, 1998)

La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que en lentecese estas reacciones bioquímicas (Avila *et al*, 2006; Cabrera, 2006).

Pero es un proceso que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula- célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Avila *et al*, 2006)

Estas dos últimas diferencias condicionan el efecto de la criopreservación sobre ambos tipos de embriones (Martinez A. , 2006).

Los periodos críticos para la sobre vida celular durante la criopreservación son la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas (Avila *et al*, 2006). A pesar de esto Vitale *et al.*, en 1994 demostraron que el embrión de bovino de calidad excelente puede tolerar 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento, y todavía mantener desarrollo *in vitro* (Barcelo, 2011).

Cuando las células son congeladas, se encuentran sometidas a un estrés resultante de la interacción agua-soluto y a la elevación de la cristalización del hielo. La cristalización induce la formación de cavidades descongeladas de solución hiperosmótica, mientras que el enfriamiento progresa aproximadamente a -50°C (Cabrera, 2006)

La obtención de un protocolo ideal para criopreservar es dependiente del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de la célula y o el tejido, puesto que este proceso está afectado por diferentes variables como especie, tipo y estadio de la célula a congelar (Avila *et al*, 2006).

El éxito de la criopreservación es inversamente correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados; criopreservar células suele ser más fácil a diferencia de hacerlo en ciertos tejidos (Avila et al, 2006).

Además se debe recordar que los embriones producidos in vitro son más sensibles y por lo tanto mucho menos viables, después del proceso de congelación y descongelación (Palma, 2001; Bàez *et al*, 2010; Stinshoff, 2011).

Este transporte a través de las membranas es el punto crítico para la supervivencia celular pos descongelación (Avila et al, 2006).

Por lo tanto, las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación en general debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura de 10°C - 16°C alterando de esta manera las funciones de la membrana y dándole un alto grado de fragilidad, durante la deshidratación celular que tiene lugar en el proceso de congelación se puede presentar una pérdida de lípidos lo cual afectaría la integridad de la membrana plasmática por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación al volver a condiciones isotónicas (Cabrera, 2006).

2.2.8.1. Fundamentos de criobiología

Sea cual fuere el método empleado la criopreservación involucra la exposición inicial de cualquier tipo celular al crioprotector, el congelamiento a temperaturas por debajo de cero, el almacenamiento, el descongelamiento, y finalmente, la remoción del crioprotector, con el retorno al ambiente fisiológico, lo que permitirá el desarrollo posterior. La condición fundamental es que las células mantengan su integridad estructural a lo largo de todo el procedimiento (Martinez A., 2006).

2.2.8.1.1. Transporte a través de las membranas durante la congelación y descongelación

La bajas temperaturas más el aumento de la rigidez de la membrana y la rapidez con la que suceden los cambios osmóticos en los procesos de congelación y

descongelación hacen muy difícil el movimiento de moléculas a través de la membrana mediante procesos de transporte activo (dependientes de ATP), la disminución de temperatura desde 25°C a 10°C reduce en un 60% la actividad de las bombas dependientes de ATP y la difusión facilitada o como transporte, en consecuencia, los procesos de difusión y ósmosis son los que predominan en los momentos de estrés osmótico (Cabrera, 2006)

2.2.8.1.2. Agentes crioprotectores (ACP)

La inclusión de crioprotectores en los medios de congelación mejora notablemente la integridad estructural de las células, a pesar de la ligera toxicidad de algunos de ellos (Cabrera, 2006)

El rol de los crioprotectores es proteger a la célula de la formación de cristales y de la alta concentración de solutos (Martinez A., 2006).

Tabla 1. Tipos de compuestos crioprotectores (Barcelo F M, 2011).

Tipos	Características	Ejemplos
Intracelulares	✓ Son de bajo peso molecular	✓ Glicerol ✓ DMSO ✓ Etilenglicol ✓ Propilenglicol
Extracelulares	✓ Son de alto peso molecular (son azúcares y proteínas) ✓ Son impermeables al embrión	✓ Sucrosa ✓ Seroalbumina bovina (BSA) ✓ Ácido hialurónico ✓ Polivinilpirrolidona(PVP) ✓ Hidrosietilo de almidón (HES) ✓ Dextranos ✓ 1,2 propanadiol (PROH)

✓ Glucoproteínas de peces del antártico (congelan a -2.5°C)

TABLA 2. Peso molecular de los principales crioprotectores (Barcelo F M, 2011).

Crioprotector (gramos)	Peso molecular
Etilenglicol (EG)	62.07
Propilenglicol (PG)	76.10
Dimetilsulfóxido (DMSO)	78.13
Glicerol	92.10

A diferencia de los espermatozoides, los embriones u ovocitos deben ser lavados para eliminar algunos crioprotectores (glicerol, DMSO) diluyéndolos en una solución, para evitar “shock” osmótico, esto es, que el agua entre más rápido al embrión que lo que sale de soluto de su interior, lo que provoca hinchazón y rompimiento de las células del embrión.

La remoción del crioprotector no es necesaria cuando se utiliza el etilenglicol o el propilenglicol, debido a que no se presenta este problema de “shock” osmótico. El menor peso molecular de estas sustancias posiblemente tiene efecto benéfico en su alta permeabilidad, lo que permite una rehidratación directa en el medio en que se encuentren (Barcelo, 2011).

2.2.8.2. Métodos de criopreservación

Hoy en día, se dispone de tres técnicas para la conservación de embriones: la congelación lenta (o clásica), la vitrificación tradicional (en pajuela) y la vitrificación ultrarrápida. Aunque la criopreservación de embriones producidos in vitro se puede abordar por técnicas de congelación lenta, algunos autores sugieren que la vitrificación es la herramienta de elección para estos embriones (Díaz, 2010) lo que es muy discutible.

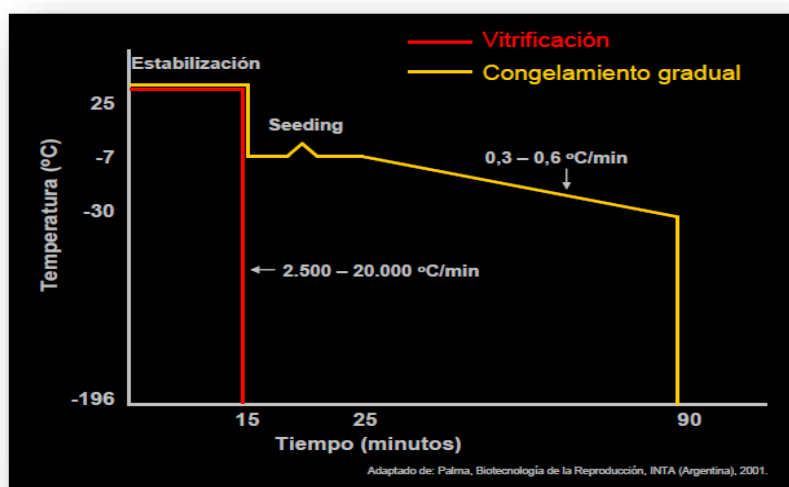


FIGURA 2. Curva de descenso de temperaturas vitrificación y congelación lenta (Palma,2001)

2.2.8.2.1. Congelación clásica.

Los embriones pueden ser conservados a -196°C utilizando el método de congelación estándar, la vitrificación o el método de congelación rápida. La principal diferencia que tiene el método de congelación estándar con respecto a los otros es que en él, el descenso de temperatura se efectúa de manera controlada utilizando equipos programables

2.2.8.2.2. Desventajas de criopreservar los embriones

Existen estudios que compararon el efecto de la congelación lenta con la vitrificación, ambos métodos sobre la morfología y metabolismo del blastocisto



bovino producido in vitro, observando disminución en el consumo de glucosa, piruvato y oxígeno en la congelación lenta, además de un incremento en la actividad glucolítica, indicando un efecto de estrés (Vasquez, 2011)

Según Barcelo, (2011):

- Requiere de un técnico capacitado y la máquina congeladora es de alto costo
- Solamente embriones de alta calidad son apropiados para congelación y el resto de los otros embriones transferibles se descartan o transfieren sin congelar, y
- Cerca del 5% de los embriones congelados-descongelados son severamente dañados.

Existen muchos procedimientos para el congelamiento-descongelamiento de embriones.

El método más comúnmente utilizado para congelar embriones de bovino ha sido utilizando glicerol como crioprotector, pero en la actualidad ha estado siendo reemplazado por otros crioprotectores como el etilenglicol (EG) y propilenglicol (PG), que son igualmente efectivos pero más prácticos que el glicerol (Barcelo, 2011). Para criopreservar embriones los mejores resultados se obtienen es estado de desarrollo de mórula compacta y joven blastocisto es decir entre 6 y medio y 7 y medio días de edad, los cuales son colectados por procedimientos estándar. Se deben utilizar solamente embriones de buena a excelente calidad. Si son embriones producidos in vitro, se debe utilizar blastocistos de 7 días de edad. La criopreservación se debe realizar preferentemente de 3 a 5 horas de recuperados los embriones. Todos los pasos se deben realizar a la temperatura del cuarto (37°C)



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales Biológicos:

- 200 ovarios de vacas recuperados de matadero de Cholet – Francia.
- Pajillas de semen seleccionado

3.1.2. Materiales Físicos:

- agujas calibre 18
- Equipo de baño maría
- Jeringuillas
- Cajas Petri de todos los tamaños
- Cajas Petri cuadriculadas
- Cajas Petri de cuatro compartimentos
- Tubos de ensayo con tapa y desechables
- Incubadora de 2 gases
- Osmómetro
- Cinta pH
- tubos Corning
- centrifugaron
- sistema CASA (Hamilton THORN Biosciences).
- placa térmica
- vortex
- pipeta graduada
- equipo de Congelación por Baño de Alcohol HUBER HS40
- pajillas de 0.25ml (IMV, L'aigle, France)
- Nitrógeno Líquido
- aceite mineral



3.1.3. Materiales Químicos:

- Solución PBS
- Solución de NaCl 0.9 normal
- Medio TCM - 199 Sigma.
- Medio Ferti – TALP 1, 2, y 3.
- BoviPureTopLayer®
- BoviPureBottomLayer®,
- Medio de cultivo clásico (SOF + BSA) según Neira et al., (2010).
- Solución 0.4% de PVP (Polivinilpirrolidone ® *Sigma*)
- Solución 0.5 mg/ml de HA (Ácido hialurónico)
- Solución 0.4% de BSA (Albumina sérica bovina ® *Sigma*)
- Solución 1.5M de GLY (Glicerol ® *Sigma*)
- Solución 1.5M de ETY (Etilenglicol)
- Solución 0.1M de SAC (Sacarosa ® *Sigma*)
- Medio de cultivo SOF + 0.5% BSF

3.2. Método

3.2.1. Ubicación del trabajo

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de la Reproducción de la Escuela Nacional Veterinaria de Nantes ONIRIS – Francia. Todos los embriones fueron producidos siguiendo protocolos tradicionales y medios preparados en este laboratorio de acuerdo con los procedimientos publicados por los científicos de ONIRIS y convenios con empresas privadas, con algunos ajustes en la metodología realizados recientemente.

3.2.2. Característica de la unidad de análisis

Se usaron 6 medios de congelación, en 3 repeticiones y 2 grupos de blastocistos jóvenes (7 y 8 días) de acuerdo a la producción de embriones in vitro (Tabla 3 y 4). En total se congelaron 176 embriones producidos totalmente in vitro bajo las mismas condiciones descritas en la metodología, de los cuales 85 embriones fueron de 7 días y 91 embriones fueron de 8 días, luego de descongelados se colocaron en un medio de cultivo homogéneo y se evaluó la reactivación del desarrollo hasta las 72 horas pos-descongelación.

Tabla 3. Embriones congelados en día 7 de desarrollo.

MEDIO CONGELACION	NUMERO DE EMBRIONES CONGELADOS			TOTAL
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
BSA – GLY	6	4	4	14
BSA – ETY	6	5	3	14
PVP – GLY	5	6	3	14
PVP – ETY	4	5	4	13
HA – GLY	5	7	4	16
HA – ET	5	5	5	15

TABLA 4. Embriones congelados en el día 8 de desarrollo.

MEDIO CONGELACION	NUMERO DE EMBRIONES CONGELADOS			TOTAL
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
BSA – GLY	4	6	6	16
BSA – ETY	4	6	6	16
PVP – GLY	3	4	5	12
PVP – ETY	3	6	8	17
HA – GLY	3	5	5	13
HA – ET	5	4	8	17



3.2.3. Metodología

3.2.3.1. Producción in vitro de embriones

3.2.3.1.1. Colecta de ovarios en matadero y aspiración folicular

Fueron seleccionados los ovarios que contenían folículos de entre 3 a 10 mm de diámetro, excluyendo ovarios con estructuras anormales como quistes foliculares, etc.; y fueron colocados en botellas de PBS a 39°C, manteniendo esta temperatura hasta llevarlas al laboratorio; los ovarios fueron lavados 2 veces con la solución de NaCl a 38,5°C, y luego se los mantuvo sumergidos en la misma solución a baño maría mientras se procede a la punción folicular. Se aspiraron los folículos con una aguja calibre 18 y una jeringuilla de 20ml y fue depositado el contenido en tubos calentados a baño maría, se aspiraron alrededor de 18 ovarios por cada tubo evitando aspirar líquido con sangre. El sedimento fue colocado en una caja Petri cuadrículada con 10 ml de medio de lavado preparado y atemperado con anterioridad.

3.2.3.1.2. Búsqueda y maduración de ovocitos

Fueron seleccionados los COC'S (complejo ovocitocumulus) oscuros, intactos, rodeados de células y que no estén aglutinados. La calidad de las envolturas celulares que rodean el ovocito y la apariencia del citoplasma son los mejores indicadores del potencial que éste posee para la maduración y fertilización in vitro (Neira J., 2011).

Luego fueron colocados en cajas de 4 compartimentos que contenían 2,5 ml de medio de lavado en cada compartimento; se pasaron los ovocitos por cada compartimento de tal forma que se vayan perdiendo los detritus proveniente de la búsqueda. Se aspiró varias veces el sedimento para obtener el mayor número de COC'S.

Antes de la maduración se previno una caja de 4 pocillos con 500 ul de medio de maduración en la incubadora de 2 gases, es ahí donde se colocaron los COC'S en grupos de entre 50 a 90, antes de la maduración fueron lavados por

última vez en el primer pocillo y puestos a madurar en el segundo pocillo por 24 horas en la misma incubadora cuya concentración de CO₂ fue de 5% y 20% de O₂; la osmolaridad de los medios utilizados fue de alrededor de 290mOsm, el pH de 7.4 y la temperatura tanto a la que se procesaron como a la que se cultivaron fue de 39°C. El proceso de maduración fue de 24 horas.

3.1.1.4. Fecundación

Para la **capacitación del semen** se colocaron en la incubadora de dos gases 2 tubos Corning de 15 ml conteniendo el primero (T) 1 ml de BoviPureTopLayer® y el segundo (B) 1 ml de BoviPureBottomLayer®, controlando que la tapa no esté asegurada, esto cuando faltaba 1 hora para terminar la maduración de los ovocitos. Luego se colocó con cuidado y sobre la pared del tubo (B) el contenido del tubo (T) para crear dos gradientes de concentración, y fueron colocados en el baño maria. Una vez que se han cumplido las 24 horas de maduración, se verificó la expansión de los ovocitos; fueron aspirados y colocados en el medio de lavado y posteriormente en el pocillo de fecundación (250 ul) y estas cajas en la incubadora hasta ser fertilizadas. Luego se descongeló la pajilla a 38°C por 30 segundos y se depositó el semen sobre la primera fracción (T) del tubo con las gradientes. Se centrifugaron a 300G por 20 minutos a 22°C, inmediatamente se quitó el sobrenadante dejando el pellet de espermatozoides en aproximadamente 100 ul, volviéndolo a agitar para re diluir. El número total de espermatozoides, el porcentaje de movilidad y el número de espermatozoides móviles fueron determinados por medio del sistema CASA (Hamilton THORN Biosciences).

La concentración final de espermatozoides para la fertilización fue entre 3 a 4 millones y cuya dilución fue calculada por la siguiente fórmula:

% Mov ➡ *Porcentaje de espermatozoides móviles.*

$$(\% \text{ Mov.} / 4) = X$$

$$\text{CANT. MEDIO FERTI POR AÑADIR} = (X \cdot 100) - 100 \text{ ul}$$



Para la inseminación se colocó 250 μ l de la dilución de espermatozoides en los pocillos con los ovocitos madurados, registrando siempre la hora de inseminación así como realizando una verificación visual; estas cajas fertilizadas fueron colocadas en la incubadora de dos gases por 18 horas.

3.1.1.4. Cultivo de embriones

Se uso el medio de cultivo clásico (SOF + BSA) usados en la cadena de producción de embriones in vitro de la Escuela Veterinaria de Nantes (Neira *et al*, 2010; Moreno *et al*, 2004). Con anterioridad fueron incubadas las cajas de cultivo con gotas de 30 μ l, un total de 16 gotas por caja, en filas de 4; cubiertas luego con 8 ml de aceite mineral e identificadas, también 2 tubos con 2 ml de medio de lavado cada uno en baño maría así como dos cajas pequeñas atemperadas sobre la placa térmica; la una con 2 ml de medio de lavado y la otra vacía. Cuando se cumplieron las 18 horas de fertilización, fueron colocados los supuestos embriones en el tubo con 2ml de medio de lavado y pasados por el vortex por 2 minutos para quitarles las células del cumulus. Este contenido fue vertido en la caja atemperada, añadimos los 2 ml del segundo tubo en el primero y pasamos nuevamente al vortex unos segundos para recoger posibles embriones en las paredes del tubo; enseguida se realizó la búsqueda y selección de los posibles embriones, fueron seleccionados los oscuros, homogéneos y libres de células.

Los embriones seleccionados fueron depositados en la segunda caja con medio de lavado y luego colocados en las cajas de cultivo en grupos de entre 20 a 29 embriones en la primera columna de gotas con una pipeta graduada a 70 μ l. Se realizó pasajes por la segunda y tercer gota y finalmente cultivados en la cuarta gota con la pipeta graduada en 40 μ l.

Posteriormente fueron verificados, registrando el número y la hora. Es importante no tardar más de 40 min desde que se los saca del medio de fertilización hasta ponerlos en cultivo. Las cajas fueron colocadas en la incubadora de 3 gases (5% de O₂, 5% CO₂ y 90% N₂)

3.1.2. Congelación de embriones

3.1.2.1. Preparación de medios de congelación y descongelación.

Se usaron 3 macromoléculas fuentes de proteína:

- ✓ 0.4% de PVP (Polivinilpirrolidone ® *Sigma*)
- ✓ 0.5 mg/ml de HA (Ácido hialurónico)
- ✓ 0.4% de BSA (Albumina sérica bovina ® *Sigma*)

Y fueron combinadas con 2 crioprotectores:

- ✓ 1.5M de GLY (Glicerol ® *Sigma*)
- ✓ 1.5M de ETY (Etilenglicol) (Ver TABLA 3).

Todos los medios usaron una solución 0.1M de SAC (Sacarosa ® *Sigma*) como amortiguador del crioprotector. Como medios de descongelación fueron preparados 3 medios de descongelación usando las 3 macromoléculas (PVP, HA y BSA) y combinadas con una solución 0.25M de SAC. Todos los medios fueron guardados a 4°C hasta su uso.

TABLA 5. Esquema de la composición de los medios utilizados.

MEDIO	MOLECULA DE PRUEBA	CRIOPROTECTOR
1	0.4% BSA	1.5M Glicerol
2		1.5M Etilenglicol
3	0.4% PVP (polivinilpirrolidone)	1.5M Glicerol
4		1.5M Etilenglicol
5	0,5mg/ml AcidoHialurónico	1.5M Glicerol
6		1.5M Etilenglicol

4.1.2.2. Proceso de congelación de embriones

Se utilizó un equipo de Congelación por Baño de Alcohol HUBER HS40. Antes del proceso se preparó varias cajas atemperadas de 4 pocillos con medio de lavado, así mismo se preparó una caja identificada con los medios SAC 0.25M

que serán los que vayan en los extremos de las pajillas. En una caja Petri pequeña identificada correctamente se colocó una gota del medio SAC 0.1M + proteína + Crioprotector, y estas a su vez sobre la placa térmica a 39°C.

Una vez identificadas las pajillas de 0.25ml (IMV, L'aigle, France) y sus tapones, fueron atemperadas; se procedió a la selección de los embriones congelables, blastocistos jóvenes y blastocistos no expandidos, que tengan estructura homogénea, con membrana íntegra (no rotos ni deformes) colocándolos en el medio de lavado y pasándolos 3 veces. Los embriones fueron colocados en la gota de 50 µl que contiene el crioprotector por 10 minutos para lograr su deshidratación, luego se procedió a cargar la pajilla con solución SAC 0.25M + proteína, Aire, la gota conteniendo el embrión, Aire y solución SAC 0.25M + proteína como indica la Figura 3 y Tabla 6.

FIGURA 3. Esquema de las partes de una pajilla.



TABLA 6. Esquema de las partes de una pajilla, medios y su composición.

Medio de descongelación	M. de congelación + embrión	Medio de descongelación
SOF + 0,25M sacarosa + molécula	SOF + 0.1M sacarosa + molécula+ 1,5M ETY ò 1.5M GLY	SOF + 0,25M Sacarosa + molécula

*ETY=Etilenglicol / GLY=Glicerol

Una vez tapadas las pajillas se verifico rápidamente que los embriones estén en la pajilla, deberán haber transcurrido alrededor de 20 minutos desde que el embrión entro en contacto con el crioprotector.

Luego se colocó las pajillas en el equipo de congelación por 5 a 10 minutos a -7°C ; inmediatamente se realizó el *SEEDING* para acelerar la congelación, esto con algodón sumergido en nitrógeno líquido, observando cómo avanza la congelación atravez de las pajillas; debieron pasar entre 5 a 10 min luego del *Seeding* y para luego iniciar el descenso de temperatura hasta a -30 a -35°C , a una velocidad de 0.3 a $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tardaron alrededor de 75 a 80 minutos, y luego las pajillas se colocaron directamente en Nitrógeno Líquido a -196°C .

3.1.2.3. Descongelación, cultivo y evaluación de embriones.

Previa a la descongelación se atempero una caja con gotas de 50 ul de medio de lavado, así mismo se previno cajas de cultivo con microgotas de 30ul de medio de cultivo SOF + 0.5% BSF sumergidas en aceite mineral. Las pajillas fueron sacadas del nitrógeno y se mantuvieron a temperatura ambiental (25°C) por 30 segundos, mientras debieron ser secadas y registradas para luego ser sumergidas en baño maría a 30°C por 30 a 45 segundos, inmediatamente se las seco y agito firmemente para lograr la mezcla de las partes internas de la pajilla, se vació el contenido en una caja Petri atemperada previamente y esperamos 3 minutos para la estabilización de los embriones, una vez buscados e identificados los embriones se los registro el número de embriones descongelados, deformes o rotos e intactos, luego se los coloco en la gota de medio de lavado por unos segundos y finalmente se los paso a las cajas de cultivo con Medio SOF + Suero Fetal Bovino (SFB) 5%, debieron ser lavados en las primeras 3 gotas y puestos a cultivar en la cuarta gota.

La primera observación se la realizo cuando se inicia el cultivo, se registraron embriones con alteraciones en la membrana (rotos), además de manera subjetiva se pudo comparar la velocidad de re-expansión de los embriones. Luego fueron evaluados a las 24, 48 y 72 horas; se registraron embriones expandidos y no expandidos así como eclosionados y no eclosionados.

3.2. Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación se recogieron en hojas de campo y fueron tabulados en una base de datos para luego ser analizados mediante el programa estadístico SPSS 20 msi.

Los resultados fueron evaluados por comparación de porcentajes de las variables; además de un análisis de Chi Cuadrado (Chi 2).

3.2.1. Variables Analizadas

Las variables son de carácter no paramétricas independientes, se analizan las siguientes variables:

- Tasa de embriones con integridad de la membrana
- Tasa de sobrevivencia pos descongelación y cultivo in vitro durante 24h, 48h y 72h.
- Número de embriones viables y transferibles después de 24h de cultivo in vitro.

3.2.2. Diseño experimental y pruebas estadísticas.

Para esta investigación se utilizó un Diseño Bloques al Azar (DBA) con arreglo factorial 2x3. Se comprobaron diferencias significativas entre los tres grupos con un Análisis de Chi cuadrado (Chi 2).

CAPITULO VI: RESULTADOS

4.1. Integridad de la Membrana

Independientemente del tratamiento, el 90,6% de los embriones de 7 días ($n=85$) que fueron descongelados tuvieron la membrana plasmática intacta y dicho porcentaje no varió en las tres evaluaciones practicadas durante 72 horas luego de la descongelación. La integridad de la membrana plasmática fue similar entre crioprotectores suplementados con proteínas sintéticas, no obstante, la adición de albumina sérica bovina aumento el número de embriones de 7 días con la membrana plasmática intacta en ambos crioprotectores, pero esta diferencia solo fue significativa con la combinación de etilenglicol más ácido hialurónico (ver tabla 7).

TABLA 7. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la integridad de la membrana plasmática (porcentaje y recuento) de embriones bovinos de 7 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total ($n=85$)
	GLY-PVP ($n=14$)	GLY-HA ($n=16$)	GLY-BSA ($n=14$)	ETY-PVP ($n=12$)	ETY-HA ($n=15$)	ETY-BSA ($n=14$)	
24 horas							
%	100,0 ^a	93,8 ^{a,b}	100,0 ^a	83,3 ^{a,b}	66,7 ^b	100,0 ^a	90,6
(n)	(14)	(15)	(14)	(10)	(10)	(14)	(77)
48 horas							
%	100,0 ^a	93,8 ^{a,b}	100,0 ^a	83,3 ^{a,b}	66,7 ^b	100,0 ^a	90,6
(n)	(14)	(15)	(14)	(10)	(10)	(14)	(77)
72 horas							
%	100,0 ^a	93,8 ^{a,b}	100,0 ^a	83,3 ^{a,b}	66,7 ^b	100,0 ^a	90,6
(n)	(14)	(15)	(14)	(10)	(10)	(14)	(77)

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de Chi-cuadrado

En cuanto al análisis de la integridad de la membrana de los embriones de 8 días no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos con sustitutos sintéticos y los que contienen albumina sérica bovina. (Ver Tabla 8)

TABLA 8. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la integridad de la membrana plasmática (porcentaje y recuento) de embriones bovinos de 8 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total (n=91)
	GLY-PVP (n=12)	GLY-HA (n=13)	GLY-BSA (n=16)	ETY-PVP (n=17)	ETY-HA (n=17)	ETY-BSA (n=16)	
24 horas							
%	91,7 ^a	84,6 ^a	93,8 ^a	94,1 ^a	88,2 ^a	93,8 ^a	91,2
(n)	(11)	(11)	(15)	(16)	(15)	(15)	(83)
48 horas							
%	91,7 ^a	84,6 ^a	93,8 ^a	94,1 ^a	88,2 ^a	93,8 ^a	91,2
(n)	(11)	(11)	(15)	(16)	(15)	(15)	(83)
72 horas							
%	91,7 ^a	84,6 ^a	93,8 ^a	94,1 ^a	88,2 ^a	93,8 ^a	91,2
(n)	(11)	(11)	(15)	(16)	(15)	(15)	(83)

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de Chi-cuadrado

4.2. Re-expansión

En cualquiera de los tratamientos el tiempo de incubación no afectó la expansión de los embriones de 7 días luego de la descongelación. La combinación de etilenglicol con ácido hialurónico o con albumina sérica bovina tuvieron los porcentajes de re-expansión embrionaria más bajos y más altos respectivamente, y solamente entre estos tratamientos la diferencia fue significativa (ver tabla 9).

TABLA 9. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la re-expansión (porcentaje y recuento) de embriones de 7 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total (n=85)
	GLY-PVP (n=14)	GLY-HA (n=16)	GLY-BSA (n=14)	ETY-PVP (n=12)	ETY-HA (n=15)	ETY-BSA (n=14)	
24 horas							
%	28,6 ^{a,b}	37,5 ^{a,b}	35,7 ^{a,b}	33,3 ^{a,b}	13,3 ^b	50,0 ^a	32,9
(n)	(4)	(6)	(9)	(8)	(13)	(7)	(28/85)

(n)							
48 horas	28,6 ^{a,b}	37,5 ^{a,b}	35,7 ^{a,b}	33,3 ^{a,b}	13,3 ^b	50,0 ^a	32,9
%	(4)	(6)	(9)	(8)	(13)	(7)	(28/85)
(n)							
72 horas	28,6 ^{a,b}	37,5 ^{a,b}	35,7 ^{a,b}	33,3 ^{a,b}	13,3 ^b	50,0 ^a	32,9
%	(4)	(6)	(9)	(8)	(13)	(7)	(28/85)
(n)							

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de Chi-cuadrado

En cuanto a la re-expansión de los embriones de 8 días no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos (ver tabla 10).

TABLA 10. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la re-expansión (porcentaje y recuento) de embriones bovinos de 8 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total (n=91)
	GLY-PVP (n=12)	GLY-HA (n=13)	GLY-BSA (n=16)	ETY-PVP (n=17)	ETY-HA (n=17)	ETY-BSA (n=16)	
24 horas	41,7 ^a	30,8 ^a	56,3 ^a	41,2 ^a	29,4 ^a	37,5 ^a	39,6
%	(7)	(9)	(7)	(10)	(12)	(10)	(36/91)
(n)							
48 horas	41,7 ^a	30,8 ^a	56,3 ^a	41,2 ^a	29,4 ^a	37,5 ^a	39,6
%	(7)	(9)	(7)	(10)	(12)	(10)	(36/91)
(n)							
72 horas	41,7 ^a	30,8 ^a	56,3 ^a	41,2 ^a	29,4 ^a	37,5 ^a	39,6
%	(7)	(9)	(7)	(10)	(12)	(10)	(36/91)
(n)							

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de Chi-cuadrado

4.3. Eclosión

El tiempo de cultivo tampoco afectó el número de embriones de 7 días que eclosionaron. Asimismo, el glicerol más albumina sérica bovina fue el tratamiento que mayor número de blastocistos eclosionados produjo, siendo la diferencia significativa con 4 de los 5 tratamientos restantes (ver tabla 11 y 12).

TABLA 11. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la eclosión (porcentaje y recuento) de embriones de 7 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total (n=85)
	GLY-PVP (n=14)	GLY-HA (n=16)	GLY-BSA (n=14)	ETY-PVP (n=12)	ETY-HA (n=15)	ETY-BSA (n=14)	
24 horas							
No							
Eclosionó							
%	92,9 ^a	81,3 ^{a,b}	50,0 ^b	91,7 ^a	93,3 ^a	92,9 ^a	83,5
(n)	(13)	(13)	(7)	(11)	(14)	(13)	(71)
Eclosionó							
%	7,1 ^a	18,8 ^{a,b}	50,0 ^b	8,3 ^a	6,7 ^a	7,1 ^a	16,5
(n)	(1)	(3)	(7)	(1)	(1)	(1)	(14)
48 horas							
No							
Eclosionó							
%	92,9 ^a	81,3 ^{a,b}	50,0 ^b	91,7 ^a	93,3 ^a	92,9 ^a	83,5
(n)	(13)	(13)	(7)	(11)	(14)	(13)	(71)
Eclosionó							
%	7,1 ^a	18,8 ^{a,b}	50,0 ^b	8,3 ^a	6,7 ^a	7,1 ^a	16,5
(n)	(1)	(3)	(7)	(1)	(1)	(1)	(14)
72 horas							
No							
Eclosionó							
%	92,9 ^a	81,3 ^{a,b}	50,0 ^b	91,7 ^a	93,3 ^a	92,9 ^a	83,5
(n)	(13)	(13)	(7)	(11)	(14)	(13)	(71)
Eclosionó							
%	7,1 ^a	18,8 ^{a,b}	50,0 ^b	8,3 ^a	6,7 ^a	7,1 ^a	16,5
(n)	(1)	(3)	(7)	(1)	(1)	(1)	(14)

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas (P < 0.05) según la prueba de Chi-cuadrado

TABLA 12. Efecto de la suplementación proteica en el crioprotector sobre la eclosión (porcentaje y recuento) de embriones bovinos de 8 días, evaluados a las 24, 48 y 72 horas de la descongelación.

Tiempo de evaluación	Tratamientos						Total (n=85)
	GLY-PVP (n=14)	GLY-HA (n=16)	GLY-BSA (n=14)	ETY-PVP (n=12)	ETY-HA (n=15)	ETY-BSA (n=14)	
24 horas							
No							
Eclosionó							
%	75,0 ^a	84,6 ^a	81,3 ^a	94,1 ^a	94,1 ^a	81,3 ^a	85,7
(n)	(9)	(11)	(13)	(16)	(16)	(13)	(78)
Eclosionó							
%	25,0 ^a	15,4 ^a	18,8 ^a	5,9 ^a	5,9 ^a	18,8 ^a	14,3
(n)	(3)	(2)	(3)	(1)	(1)	(3)	(13)
48 horas							
No							
Eclosionó							
%	75,0 ^a	84,6 ^a	81,3 ^a	94,1 ^a	82,4 ^a	68,8 ^a	81,3
(n)	(9)	(11)	(13)	(16)	(14)	(11)	(74)
Eclosionó							
%	25,0 ^a	15,4 ^a	18,8 ^a	5,9 ^a	17,6 ^a	31,3 ^a	18,7
(n)	(3)	(2)	(3)	(1)	(3)	(5)	(17)
72 horas							
No							
Eclosionó							
%	75,0 ^a	76,9 ^a	75,0 ^a	94,1 ^a	82,4 ^a	68,8 ^a	79,1
(n)	(9)	(10)	(12)	(16)	(14)	(11)	(72)
Eclosionó							
%	25,0 ^a	23,1 ^a	25,0 ^a	5,9 ^a	17,6 ^a	31,3 ^a	20,9
(n)	(3)	(3)	(4)	(1)	(3)	(5)	(19)

Letras diferentes en cada línea indican diferencias significativas ($P < 0.05$) según la prueba de Chi-cuadrado





CAPITULO V: DISCUSIÓN

5.1. Discusión

Actualmente se busca producir embriones in vitro remplazando los medios primitivos (suplementados frecuentemente con suero) (Neira et al, 2010) por medios de cultivo químicamente definidos (sintéticos) y libres de suero (Mucci N, 2003; Mucci et al, 2006; Moreno et al, 2004; Inaba, 2010; Palomares N, 2004; Nowshari y Brem, 2000; Momozawa y Fukuda, 2011) en los cuales cada uno de sus componentes pudiera ser estudiado en función del efecto que genera sobre el desarrollo embrionario, su sobrevivencia pos-criopreservación, la tasa de gestación y el porcentaje de crías viables. (Mucci et al, 2006). Las razones prácticas por las que se usan medios definidos son porque estos son reproducibles en diferentes momentos, en laboratorios diferentes, que pueden variar de una manera controlada, y están libres de actividad biológica desconocida tales como enzimas y factores de crecimiento que pueden afectar a las respuestas estudiadas (Côté, 2007; Block et al, 2010; Mucci et al, 2006; Martínez et al, 1998).

Entre los estudios de **medios de cultivo** Stojkovic et al (1992) logra 31% de embriones viables de 7 días (n=2012) luego de cultivados en medio clásico de SOF + BSA; 35.6% de embriones viables y 38.2 % de embriones viables de 7 y 8 días respectivamente para embriones cultivados en medio SOF + HA (Thompson et al, 1998). Block et al (2009) realizó vitrificación de embriones con un medio con diferentes cantidades de HA obteniendo 38.9% de re expansión y 8.4% de eclosión a las 24 h de cultivo cuando se utiliza 0.5 mg/ml de HA (Block, 2010). Otros estudios por lo contrario reportan aumentos significativos en el rendimiento del blastocisto cuando al medio de cultivo se reemplaza el BSA por 1 mg/ml de ácido hialurónico (Furnus y Martinez, 1998)

El uso de polímeros sintéticos, como el alcohol polivinílico y la polivinilpirrolidona, es frecuente desde hace varios años en la producción in vitro de embriones (Naitana et al, 1997; Gardner y Lane, 1998; Momozawa y Fukuda, 2011). Estos compuestos han demostrado proveer una buena actividad surfactante, similar a

la albúmina, aunque se ha encontrado una menor tasa de producción de embriones y diferencias metabólicas importantes entre embriones cultivados con o sin estos componentes (Thompson, 2000; Orsi y Leese, 2004)

Existen estudios anteriores en los cuales el medio de cultivo clásico es comparado con medios sin BSA y que en su lugar utilizan sustitutos sintéticos tales como ácido hialurónico (Block et al, 2010; Furnus y Martinez, 1998; Martínez et al, 1998) o polivinilpirrolidone (Moreno et al, 2004) y cuyos embriones son evaluados en su desarrollo y viabilidad; sin embargo las tasas de blastocistos y eclosionados aún no han podido asemejarse a los producidos en medios clásicos con BSA, incluso algunos autores aseguran que la omisión del suero en el medio de cultivo puede significar problemas en la crio tolerancia de los embriones (Rizos et al, 2003).

Pero las investigaciones no solo se centran en los medios de cultivo, también los **medios de maduración** (Restrepo y Vasquez, 2009) son estudiados constantemente buscando reemplazar la BSA de uso convencional por moléculas sintéticas teniendo resultados muy alentadores (Momozawa y Fukuda, 2011; Restrepo y Vasquez, 2009). Estudios como el de Joly et al, (1992) reportaron diferencias no significativas entre embriones ovinos y de ratones; congelados con medio con BSA y con 1 mg / ml de HA obteniendo 75% de sobrevivencia.

Por otra parte existen estudios que analizaron el efecto de la congelación lenta sobre la morfología y metabolismo del blastocisto bovino producido in vitro, se observó un efecto de estrés (Vasquez, 2011) por lo que al sustituir el BSA por PVP o HA y al no tener investigaciones previas de referencia que utilicen congelación lenta y al mismo tiempo omitan del uso de BSA usando más bien un sustituto sintético se podría esperar tasas de supervivencia mínimas, sin embargo las tasas de viabilidad logradas en esta investigación (n=177) de 66.7% en embriones de 8 días congelados con medio con glicerol + PVP; 56.3% en embriones de 7 días congelados con glicerol + HA resultan muy alentadoras, tomando en cuenta la fragilidad de los embriones al ser sometidos a

criopreservación. Así mismo se obtuvo tasas de eclosión con diferencias estadísticamente no significativas ($P>0,05$) para embriones congelados a los 7 días. A pesar de los lograr sobrevivencia de los embriones congelados en medios totalmente sintéticos no se logró alcanzar la eficiencia de los medios de congelación que usan BSA, cuya causa principalmente se debe a la gran actividad surfactante que posee así como la composición aún desconocida la cual podría estar afectando el desarrollo de los embriones por lo que resulta importante mejorar el medio de congelación hasta niveles aceptables comparados con los resultados de los medios de congelación clásicos.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Es posible sustituir los productos biológicos animales en los medios de congelación por moléculas sintéticas (en el caso de Ácido Hialurónico y Polivinilpirrolidone), convirtiéndose en una manera eficaz de garantizar mayor control sanitario en todos los procesos.
- Con la excepción de algunas comparaciones concretas entre tratamientos, en general la adición de proteínas de origen animal a los crioprotectores usados no representó una ventaja sobre la combinación de estos con proteínas sintéticas.
- El uso de proteínas sintéticas en los medios de congelación puede ser una alternativa efectiva para mantener los medios de congelación químicamente definidos y de evitar los riesgos sanitarios que implica el uso de productos de origen animal.

4.2. Recomendaciones

- Los nuevos estudios abren la posibilidad de conseguir medios totalmente sintéticos, libres de moléculas biológicas y riesgos sanitarios; sin embargo resulta importante determinar la viabilidad de estos embriones al ser transferidos de manera directa.
- Resultaría importante investigar los mismos medios sintéticos con diferentes cantidades, además de usar nuevos métodos de evaluación de los embriones, menos subjetivos al criterio personal.
- Cada uno de los procesos de producción in vitro de embriones es importante y esencial; descuidar cualquiera de ellos repercute en la tasa final de producción. Es por esto que, el técnico o investigador debe estar en constante entrenamiento permitiendo incluso tener criterios sobre el proceso y mejorarlo.



BIBLIOGRAFIA

- AETE. (2009). *National Statistic Data of the Embryo Transfer Activity. 25th Scientific Meeting of the AETE*. Recuperado de <http://www.aete.eu>
- Argov, N. A. (2004). *Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells*. Recuperado de <http://www.theriojournal.com>
- Avila, L., Madero, J., Lopez, C., & Leon, M. (2006). *FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACION*. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx>
- Bàez, F., Landinez, J., Hernández, H., & Villamedina, P. (2010). *Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados in vitro obtenidos a partir de hembras mestizas*. Recuperado de <http://revfacagronluz.org.ve>
- Barcelo F M, (2011). *MANUAL DE PRÁCTICAS BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN*. Ciudad Juarez, Chihuahua.
- Berg, U., & Reichenbach, H. (1992). *PRODUCCION IN VITRO DE EMBRIONES. Reprobiotic*, 120 - 140.
- Block, J., Bonilla, L., & Hansen, P. (October de 2010). *Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. Theriogenology*, 71, 1063 - 1071. Recuperado de <http://www.theriojournal.com>
- Bols, P. (2001). *Punción folicular (Ovum Pick-Up, OPU) en la vaca*. Recuperado de <http://www.reprobiotec.com>
- Brackett, B., & Harper, K. (1993). *Bovine Blastocyst Development after In Vitro Maturation in a Defined Medium with Epidermal Growth Factor and Low Concentrations of Gonadotropins*. Recuperado de <http://www.biolreprod.org>



- Brackett, B., Bousquet, D., Boice, M., Donawick, W., Evans, J., & Dressel, M. (1982). *Normal Development following in vitro Fertilization in Caw*. Obtenido de <http://www.biolreprod.org>
- Cabodevila, J. (s.f.). *CONSERVACION DE EMBRIONES*. Recuperado de <http://www.reprobiotec.com>
- Cabrera, P. y. (2006). *Criopreservación De Embriones: Una Herramienta Básica en la Reproducción Asistida*. Recuperado de <http://www.scielo.org.ve>
- Camargo, L., & Viana, J. (Mar de 2006). *Factors influencing in vitro embryo production*. Recuperado de <http://www.cbra.org.br/page>
- Contreras, F. B., & al, e. (2010). Evaluación del desarrollo embrionario de ovocitos bovinos madurados y fecundados in vitro obtenidos a partir de hembras mestizas. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*.(27), 460 - 478.
- Côté, I. (2007). *Étude de l'impact des conditions de culture in vitro sur l'expression génétique embryonnaire chez le bovin*. (U. Laval, Ed.) Recuperado de www.theses.ulaval.ca
- Daniaux, C. (2008). *Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer*. Recuperado de <http://www.theriojournal.com>
- Denis, R. (2008). *Aspiración folicular in vivo (opu) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción*. Recuperado de <http://bva.fao.cu>
- Díaz, C. y. (2010). *Biotechnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones bovinos in vitro*. Recuperado de <http://ria.asturias.es>
- Fernandez A, e. a. (2007). *Producción In vitro de embriones bovinos*. (U. C. Venezuela, Editor) Recuperado de <http://www.scielo.org.ve>
- Fernandez, F., Hernandez, J., & Pichardo, A. (2007). Maduración in vitro de ovocitos de ovino usando concentraciones de FSH + LH y FSH en medio de cultivo. *Revista de Salud Animal*, 19(2), 105 - 110.



- Fukuda, Y., Ichikawa, M., Naito, K., & Toyoda, Y. (1990). *Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage*. Recuperado de <http://www.biolreprod.org>
- Furnus, C., & Martinez, A. (1998). Efecto del ácido hialurónico en el desarrollo in vitro de embriones de bovinos. *Theriogenology*, 49(8), 1489-1499.
- Gallegos, M. (1998). *Fertilizacion in vitro de ovocitos bovino*. Recuperado de <http://cdigital.dgb.uanl.mx>
- Gardner, D., & Lane, M. (1998). *Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media*. Recuperado de <http://humrep.oxfordjournals.org>
- Gibbons, J. R., Beal, W., Krisher, R., Faber, E., Pearson, R., & Gwazdauskas, F. (1994). *Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Grooms, D., Brock, K., Pate, J., & Day, M. (1998). Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology*, 49(3), 595 - 605.
- Guienne, M. -L. (1991). Test de fertilité chez l'animal domestique par fécondation in vitro = In vitro fertilization used as evaluation of fertility ability in domestic animals. *Contraception, fertilité, sexualité*, 19(10), 819 - 824.
- Hanzen, P. C. (2012). La production d'embryons in vitro. (S. d. production., Ed.)
- Hidalgo, C., Fernandez, I., Duque, P., Facal, L., Diaz, E., Prendes, J., Diaz, C. (2002). *Primeros terneros producidos in vitro tras puncion ecoguiada defoliculos ovaricos*. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx>
- Inaba, Y. y. (2010). Los efectos del suplemento sericina EN IN VITRO MEDIO DE CULTIVO EN EL DESARROLLO Y DE BOVINO CRYOSURVIVAL IN VITRO madurado- IN VITRO -embriones fertilizados. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 205 - 206.



- Joly, T., Thibier, M., & Nibart, M. (1992). Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep freezing of embryos from mice and sheep: An in vitro investigation. *Theriogenology*, 37(2), 473 - 480.
- Kruip, T., Boni, R., Wurth, Y., Roelofsen, M., & Pieterse, M. (1994). *Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Lane, M., & Gardner, D. (1998). Amino acids and vitamins prevent culture induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction*, 13, 991 - 997.
- Langendonck, V., Donnay, I., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., & Dessy, F. (1997). *Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium*. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org>
- Martinez, A. (2006). *Optimizacion de los metodos de criopreservacion de embriones bovinos y ovinos*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales / Centro de Investigaciones Reproductivas Pérez Compagn, Buenos Aires.
- Martínez, A. G., Furnus, C., & De Matos, D. (1998). *Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Martinez, B. (2002). Estudio de la fecundación "in vitro" en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción "in vitro" de embriones. Madrid, España.
- McGowan, M., & Kirkland, P. (2007). El Impacto del virus de la diarrea viral bovina (DVB) sobre el resultado del uso de biotecnologías reproductivas en rodeos lecheros y de carne. *VII Simposio Internacional de reproducción internacional*, (págs. 89 - 98). IRAC.



- Memili, E., & First, N. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, 8, 87 - 96.
- Momozawa, K., & Fukuda, Y. (2011). *Establishment of an Advanced Chemically defined medium for early embryos derived from in vitro matured and fertilized bovine oocytes*. Recuperado de <https://www.jstage.jst.go.jp>
- Moreno, A., Avila, M., Peña, M., & Neira, J. A. (2004). Alternativas de utilización de moléculas sintéticas o definidas para el reemplazo de productos biológicos en la criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(4), 339.
- Mucci, N. (2003). *Efecto del suero sobre la produccion in vitro de embriones*. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr>
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G., Hozbor, F., & Alberio, R. (2006). *Producción in vitro de embriones bovinos : suplementación de los medios de cultivo con suero*. Recuperado de <http://www.scielo.cl>
- Mullen, S. F., Agca, Y., Broermann, D. C., Jenkins, C. L., Johnson, C. A., & Critser, J. K. (2004). The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Human Reproduction*, 19(5).
- Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M., & Cappai, P. (August de 1997). *Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development*. Recuperado de <http://www.journals.elsevierhealth.com>
- Neira, J. (2011). Biotecnologías de la reproducción. *Modulo 12, Maestria Reproduccion Animal*. Cuenca.
- Neira, J., Tainturier, D., Peña, M., & Martal, J. (2010). *Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro*. Obtenido de <http://www.theriojournal.com>



- Neira, J., Taiturier, D., Peña, M., & Martal, J. (2010). *Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro*. Obtenido de <http://www.theriojournal.com>
- Nibart, M., Silva Peixer, M., Thuard, J. M., Durand, M., Guyader Joly, C., Ponchon, S., . . . Humblot, P. (1995). Embryo production by OPU [ovum pick up] and IVF [in vitro fertilization] in dairy cattle. *Proceedings of the 2. meeting "Rencontres autour des recherches sur les ruminants"*. Institut de l'Elevage, Paris (France).
- Nowshari, M. A., & Brem, G. (2000). *The protective action of polyvinyl alcohol during rapid freezing of mouse embryos*. Recuperado de <http://www.theriojournal.com>
- Orsi, N., & Leese, H. (2004). *Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol*. Recuperado de <http://www.theriojournal.com>
- Oyuela, A. (2009). *Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones producidos in-vitro, en razas cebuinas*. (U. Nacional, Ed.) Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co>
- Oyuela, L. (2010). *Factores que afectan la tasa de preñez en programas de transferencia de embriones*. Recuperado de <http://www.scielo.org.co>
- P, B. (2001). Punción folicular (ovum pick-up, opu) en la vaca. *Reprobiotic*, 289 - 296.
- Palma, G. (2001). *Biotechnologías de la reproducción*. Recuperado de <http://books.google.com.ec>
- Palomares N, R. y. (2004). *Efecto del factor de crecimiento epidermal (egf) durante la maduración de oocitos sobre la producción in vitro de embriones bovinos*. Recuperado de <http://www.saber.ula.ve>
- Restrepo, G., & Vasquez, N. (2009). *Efecto de la maduración in vitro de oocitos bovinos con suero fetal bovino sobre su actividad mitocondrial post-desvitrificación*. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx>

- Rizos, D., Gutierrez, A., Paez, S., De la Fuente, J., Boland, M., & Lonergan, P. (2003). Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression¹. *Biology of Reproduction*, 68, 236 - 243.
- Roa, N. y. (1998). *Metodos y aplicaciones de la crioconservacion de oocitos y embriones en bovinos y otros mamiferos*. Recuperado de <http://revistas.luz.edu.ve>
- Salgado, R., Rugeles, C., & Alvarez, J. (2005). Efecto de la heparina y de la concentracion espermatica sobre el porcentaje de fertilizacion de oocitos bovinos in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 122-126.
- Singh, E. (1990). Recommendations for the sanitary handling of Embryos. *Manual I.E.T.S.*, 41 - 45.
- Stinshoff, H. y. (2011). Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 76(8), 1433 - 1441.
- Tarazona AM, A., Rodríguez, J., Restrepo, L., & Olivera, M. (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod Dom Anim*, 41, 5 - 11.
- Tarazona, A., Olivera, A., & Lenn, Y. (2010). Mitochondrial rol and oxidative stress in the developmental blockade of in vitro produced bovine embryos. *Arch Med Vet*, 42, 125 - 133.
- Thibier, M. (1994). L'originalité de la surveillance sanitaria et veterinaire do transfer embryonnaire. *Bull Soc. Vet. de France*, 78, 194 - 203.
- Thibier, M. (2011). Embryo transfer: a comparative biosecurity advantage in international movements of germplasm. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 1(30), 177 - 188. Obtenido de www.oie.int
- Thibier, M., & Guerin, B. (1993). Le controle de qualite sanitaire du tranfert d'Embryons Bovins: Six annees d'experience franaise. *Bull. Acad. Vet. De France*, 66, 429 - 438.



- Thibier, M., & Nibart, M. (July de 1992). *Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Thompson, J. G. (July de 2000). *In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C., Lambert, M. G., & Tervit, H. R. (1998). *Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Thompson, J. G., Gasparrini, B., Pasqualini, S., & De Matos, D. (2002). *Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>
- Thompson, J. G., Perdiz, R. J., Houghton, F., Cox, E., & Leese, H. (1996). *Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos*. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org>
- Trounson, A., Anderiesz, C., & Jones, G. (2001). Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, 121, 51 - 75.
- Vasquez, M. (2011). Evaluación de dos métodos de criopreservación de embriones de llamas sobre las tasas de supervivencia in vivo e in vitro. *Rev Inv Vet Perú*, 22(3), 190 - 198.
- Velilla G, T. (2002). Propiedades termodinámicas de macromoléculas en solución; caso de estudio: polivinilpirrolidona.
- Vireque AA, e. a. (Mar de 2009). *Preimplatation development and expresion of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes maduret in alpha - MEM supplemented with groth factors ad synthetic macromolecules*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com>





ANEXO 1. Tabla de resultados de embriones de 7 días evaluados a las 24,48 y 72 horas.

MEDIO DE CONGELACION	Total Emb.	Perdidas	24 h						48 h						72 h						TOTAL
	Congelados (n)	pos-des Congelación	NO		Expandidos		Eclosionados		NO		Expandidos		Eclosionados		NO		Expandidos		Eclosionados		VIABLES
			Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	Expandidos (n) (%)	
Glicerol + PVP	14	0	9 64,3	4 28,6	1 7,1				9 64,3	4 28,6	1 7,1				9 64,3	4 28,6	1 7,1				5 35,7
Glicerol + Ac. Hyaluronico	16	1	6 37,5	6 37,5	3 18,8				6 37,5	5 31,3	4 25,0				6 37,5	5 31,3	4 25,0				9 56,3
Glicerol + BSA	14	0	2 14,3	5 35,7	7 50,0				2 14,3	5 35,7	7 50,0				2 14,3	5 35,7	7 50,0				12 85,7
Etilenglicol + PVP	13	2	7 53,8	3 23,1	1 7,6	92,3			7 53,8	3 23,1	1 7,7				7 53,8	3 23,1	1 7,7				4 30,8
Etilenglicol + Ac. Hyaluronico	15	5	7 46,7	2 13,3	1 6,7				7 46,7	2 13,3	1 6,7				7 46,7	2 13,3	1 6,7				3 20,0
Etilenglicol + BSA	14	0	6 42,9	7 50,0	1 7,1				6 42,9	7 50,0	1 7,1				6 42,9	7 50,0	1 7,1				8 57,1
TOTAL	86	8																			



ANEXO 2. Tabla de resultados de embriones de 8 días evaluados a las 24,48 y 72 horas.

MEDIO DE CONGELACION	Total Emb.	Perdidas	24 h						48 h						72 h						TOTAL EMBRIONES	
	Congelados	pos-des Congelación	NO		Expandido		Eclosionados		NO		Expandidos		Eclosionados		NO		Expandidos		Eclosionados		VIABLES	
			(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Glicerol + PVP	12	1	3	25,0	5	41,7	3	25,0	3	25,0	5	41,7	3	25,0	3	25,0	5	41,7	3	25,0	8	66,7
Glicerol + Ac. Hyaluronico	13	2	5	38,5	4	30,8	2	15,4	4	30,8	5	38,5	2	15,4	4	30,8	4	30,8	3	23,1	7	53,8
Glicerol + BSA	16	1	3	18,8	9	56,3	3	18,8	3	18,8	9	56,3	3	18,8	3	18,8	8	50,0	4	25,0	12	75,0
Etilenglicol + PVP	17	1	8	47,1	7	41,2	1	5,8824	8	47,1	7	41,2	1	5,9	8	47,1	7	41,2	1	5,9	8	47,1
Etilenglicol + Ac. Hyaluronico	17	2	9	52,9	5	29,4	1	5,9	7	41,2	5	29,4	3	17,6	7	41,2	5	29,4	3	17,6	8	47,1
Etilenglicol + BSA	16	1	6	37,5	6	37,5	3	18,8	6	37,5	4	25	5	31,3	6	37,5	4	25,0	5	31,3	9	56,3
TOTAL	91	8																				